



Universidad Nacional Mayor de San Marcos

Universidad del Perú. Decana de América

Dirección General de Estudios de Posgrado

Facultad de Medicina Veterinaria

Unidad de Posgrado

**“Desarrollo de una vacuna contra *Escherichia coli*
para alpacas y su evaluación en un modelo murino”**

TESIS

Para optar el Grado Académico de Doctor en Medicina
Veterinaria

AUTOR

Juan José SIUCE MORENO

ASESOR

Dr. Abelardo Lenin MATURRANO HERNÁNDEZ

Lima, Perú

2019



Reconocimiento - No Comercial - Compartir Igual - Sin restricciones adicionales

<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>

Usted puede distribuir, remezclar, retocar, y crear a partir del documento original de modo no comercial, siempre y cuando se dé crédito al autor del documento y se licencien las nuevas creaciones bajo las mismas condiciones. No se permite aplicar términos legales o medidas tecnológicas que restrinjan legalmente a otros a hacer cualquier cosa que permita esta licencia.

Referencia bibliográfica

Siuce J. Desarrollo de una vacuna contra *Escherichia coli* para alpacas y su evaluación en un modelo murino [Tesis]. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Medicina Veterinaria, Unidad de Posgrado; 2019.

Información complementaria

Código ORCID del asesor : 0000-0001-8819-7335

Autor DNI : 42807429

Asesor DNI : 15725076

Código ORCID del autor : 0000-0002-9673-7853

Grupo de investigación:

(SANIGEN) BIOTECNOLOGIA APLICADA A LA CONSERVACIÓN, SANIDAD Y PRODUCCIÓN ANIMAL

Financiamiento:

Fondo Nacional de Desarrollo Científico, Tecnológico y de Innovación Tecnológica (FONDECYT) por el Programa Doctoral en Medicina Veterinaria (Convenio de Subvención N° 215-2014 – Fondecyt).

Ubicación geográfica donde se desarrolló la investigación:

Laboratorio de la Facultad de Microbiología, Inmunología y Bioquímica de *The University of Tennessee Health Science Center* – Estados Unidos. [\(35.140470, -90.030525\)](#)

Laboratorio de Facultad de Medicina Veterinaria de la UNMSM. W296+8W San Borja

Año o rango de años que la investigación abarcó : 4 años



UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS
Universidad del Perú, DECANA DE AMÉRICA
Facultad de Medicina Veterinaria
UNIDAD DE POSGRADO



ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS PARA OPTAR EL GRADO ACADÉMICO DE
DOCTOR EN MEDICINA VETERINARIA

En el Auditorio de la Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, siendo las 10:00 horas del día viernes 23 de agosto de 2019, el Jurado Examinador de Tesis de Grado de Magíster, presidido por el Dr. Raúl Héctor Rosadio Alcántara (**Presidente**) y constituido por los siguientes miembros: Dr. Cesar Miguel Gavidia Chucán, Dr. Abelardo Lenin Maturrano Hernández (Asesor) y Dra. Susana Gutiérrez Moreno, se dio inicio a la sustentación oral y pública de la Tesis intitulada:

"DESARROLLO DE UNA VACUNA CONTRA *Escherichia coli* PARA ALPACAS Y SU EVALUACIÓN EN UN MODELO MURINO", presentado por el Magíster:

JUAN JOSÉ SIUCE MORENO

Quien sustentó la Tesis para obtener el Grado Académico de Doctor en Medicina Veterinaria y absolvió satisfactoriamente las preguntas y objeciones formuladas por el Jurado y practicada la votación obtuvo la calificación de: **EXCELENTE (19) DIECINUEVE**

A continuación, el Presidente del Jurado recomendó a la Unidad de Posgrado de la Facultad de Medicina Veterinaria, proponga el otorgamiento del **Grado Académico de Doctor en Medicina Veterinaria**, al Magíster **Juan José Siuce Moreno**.

Siendo las 11:50 horas del día viernes 23 de agosto de 2019, se dio por concluido el acto académico, suscribiéndose la presente Acta.

.....
Dr. Raúl Héctor Rosadio Alcántara (P.P.T.C)
Presidente

.....
Dr. Cesar Miguel Gavidia Chucán (P.P.D.E)
Miembro

.....
Dr. Abelardo Lenin Maturrano Hernández (P.P.D.E)
Miembro (Asesor)

.....
Dra. Susana Gutiérrez Moreno
Miembro (Externo)

.....
Dr. César Miguel Gavidia Chucán (P.P.D.E.)
Director de la Unidad de Posgrado
Facultad de Medicina Veterinaria - UNMSM

A Carlos, Miguel, Joanna y Lesly por
alumbrar los días oscuros, y la compañía al
sonreír.

AGRADECIMIENTOS

A Lenin Maturrano, por la oportunidad, confianza y dirección en el desarrollo de la tesis.

A María Gomes-Solecki, por la gran experiencia en su laboratorio y el gran aporte en el diseño del presente trabajo.

A Raúl Rosadio, por los consejos y recomendaciones en el desarrollo del proyecto.

Al completo equipo de investigación de UBIGEM, por permitirme un espacio en el laboratorio, su compañía y sobre todo la gran colaboración en el desarrollo y ejecución de la tesis, muchas gracias.

A Cesar Gavidia por el aliento constante y el aporte en el análisis estadístico.

A Fondo Nacional de Desarrollo Científico, Tecnológico y de Innovación Tecnológica (FONDECYT) por el Programa Doctoral en Medicina Veterinaria (Convenio de Subvención N° 215-2014 – Fondecyt).

CONTENIDO

	Pág.
RESUMEN	vi
ABSTRACT	vii
LISTA DE FIGURAS	viii
LISTA DE CUADROS	x
LISTA DE ABREVIATURAS	xii
I. INTRODUCCIÓN	1
II. REVISION BIBLIOGRÁFICA	3
2.1. SANIDAD EN CRÍAS DE ALPACAS	3
2.1.1. La alpaca	3
2.1.2. Producción de Alpacas en el Perú	4
2.1.3. Sanidad de neonatos en alpacas	4
2.1.3.1. Enterotoxemia	5
2.1.3.2. Diarrea neonatal	6
2.2. ESCHERICHIA COLI	7
2.2.1. Biología de <i>Escherichia coli</i>	7
2.2.2. Características genéticas y diversidad de <i>Escherichia coli</i>	8
2.2.3. Mecanismos de patogenicidad y factores de virulencia de <i>Escherichia coli</i>	8
2.2.3.1. <i>Escherichia coli</i> Enteropatógena (EPEC)	8
2.2.3.2. <i>Escherichia coli</i> Enterotoxigénica (ETEC)	9
2.2.3.3. <i>Escherichia coli</i> productora de Shiga Toxina (STEC)	9
2.2.3.4. <i>Escherichia coli</i> Enteroagregativa (EAEC)	10
2.2.3.5. <i>Escherichia coli</i> Enteroinvasiva (EIEC)	10
2.2.3.6. <i>Escherichia coli</i> de Agregación Difusa (DAEC)	11
2.2.4. Fimbrias de <i>Escherichia coli</i>	11
2.2.5. <i>Escherichia coli</i> en animales	11
2.2.5.1. <i>Escherichia coli</i> en Alpacas	12

2.3.	INMUNIDAD DE ALPACAS	13
2.3.1.	Células del Sistema inmune de la alpaca	14
2.3.2.	Respuesta Inmune en Alpacas	15
2.4.	CONCEPTOS BASICOS DE VACUNACION	16
2.4.1.	Vacuna	17
2.4.2.	Inmunización Activa	17
2.4.3.	Inmunización Pasiva	17
2.4.4.	Tipos de Vacunas	18
2.4.4.1.	Toxoides	18
2.4.4.2.	Vacunas muertas o inactivadas	18
2.4.4.3.	Vacunas de Sub unidades	18
2.4.4.4.	Vacunas atenuadas	19
2.4.4.5.	Vacunas de última generación	19
2.4.4.6.	Adyuvante	21
2.5.	INMUNOLOGÍA DE LA VACUNACIÓN	21
2.5.1.	Componentes y función de la Inmunidad Innata	21
2.5.2.	Componentes y función de la inmunidad adquirida	23
2.5.3.	Mecanismos efectores de la respuesta inmune	24
2.5.3.1.	Reconocimiento de moléculas extrañas	25
2.5.3.2.	Eliminación de patógenos	26
2.5.3.3.	Inducción de Memoria Inmunológica	27
2.6.	VACUNACIÓN CONTRA <i>Escherichia coli</i> EN ANIMALES	30
2.6.1.	Vacunas Inactivadas o bacterinas	30
2.6.2.	Vacunas Recombinantes	31
2.6.3.	Vacunas Vivas	32
III.	MATERIALES Y MÉTODOS	33
3.1.	LUGAR DE ESTUDIO	33
3.2.	DETECCIÓN DE GENES DE VIRULENCIA Y FIMBRIALES	35
3.2.1.	Cepas de <i>Escherichia coli</i>	35
3.2.2.	Cepas de control	35
3.2.3.	Detección genética	35

3.3.	DESARROLLO Y EXPRESIÓN DEL ANTÍGENO VACUNAL	36
3.3.1.	Plásmidos de expresión	36
3.3.1.1.	pET-9a	36
3.3.1.2.	pET-28 ^a	36
3.3.2.	Vector de expression	37
3.3.3.	Producción del vector y expresión del antígeno vacunal	37
3.3.4.	Purificación del antígeno vacunal (F17)	38
3.3.5.	SDS-PAGE	39
3.4.	EVALUACION <i>in vitro</i>	39
3.4.1.	Obtención de leucocitos circulantes	39
3.4.2.	Evaluación de la respuesta inmune	40
3.5.	EVALUACION <i>in vivo</i> I	43
3.5.1.	Ratones	43
3.5.2.	Cuantificación y viabilidad de la vacuna	43
3.5.3.	Grupos de evaluación	44
3.5.4.	Inmunización, desafío y obtención de muestras	44
3.5.5.	Elisa IgG e IgA	44
3.5.6.	Extracción de Proteínas totales en heces	45
3.5.7.	Extracción de ADN fecal	46
3.5.8.	Cuantificación de UFC mediante PCR en Tiempo Real	46
3.6.	EVALUACION <i>in vivo</i> II	47
3.7.	ANÁLISIS ESTADÍSTICO	47
IV.	RESULTADOS	48
4.1.	DETECCIÓN DE GENES DE VIRULENCIA Y FIMBRIAS	48
4.2.	PRODUCCIÓN DEL ANTÍGENO VACUNAL pET-9 ^a	50
4.3.	CARACTERIZACIÓN DEL ANTÍGENO VACUNAL PET-28 ^a	51
4.4.	PURIFICACIÓN PROTEICA	52
4.5.	WESTERN BLOT	52
4.6.	EVALUACION <i>in vitro</i>	53

4.6.1.	IFN – gamma	54
4.6.2.	TNF- α	55
4.6.3.	IL-2	55
4.6.4.	IL-4	56
4.6.5.	IL-10	56
4.7.	EVALUACION <i>in vivo</i> I	57
4.7.1.	IgG	57
4.7.2.	IgG1	58
4.7.3.	IgG2a	59
4.7.4.	IgG2b	61
4.7.5.	IgA	62
4.7.6.	Evaluación de la carga bacteriana (UFC/g)	62
4.8.	EVALUACION <i>in vivo</i> II	63
4.8.1.	Variación de peso	63
V.	DISCUSIÓN	67
VI.	CONCLUSIONES	80
VII.	BIBLIOGRAFÍA CITADA	81
VIII.	ANEXOS	94

RESUMEN

Escherichia coli puede causar diarreas y producir la muerte en crías y alpacas de temprana edad. Por ello, el presente estudio tuvo como objetivo evaluar una vacuna recombinante en un modelo murino contra *Escherichia coli* enterohemorrágica (EHEC). Para ello, se detectaron genéticamente los patotipos y tipos fimbriales de *E. coli*, en aislados de alpacas con cuadros entéricos y fatales, obteniendo 42/226 (18.58%) aislados patogénicos, de los cuales el (24/42) 57% poseen el tipo fimbrial F17, cuya subunidad de la adhesión fue insertada y expresada en BL21 (pET-9a). Luego, se evaluó la inmunogenicidad de F17 y el Vector en células mononucleares periféricas de sangre (PBMC) de alpaca, la cual estimuló la producción de citoquinas de Th1/Th2, predominantemente IFN- γ e IL-4. Posterior a ello, se inmunizó ratones BALB/c por vía oral con BL21-F17+, se recolectó sangre y heces para la medición de anticuerpos IgG e IgA, respectivamente, a los 14, 28 y 42 días, obteniendo niveles serológicos significativamente mayores de IgG total (DO:1.115); control (<DO:0.53) con predominio de las subclases IgG2a/IgG2b sobre IgG1; y en heces los niveles de IgA en animales inmunizados (DO:1.206); control (<DO:0.330) fueron significativamente incrementados en las 3 evaluaciones. Para finalmente, evaluar la eficiencia de la vacuna desafiando los ratones inmunizados con una cepa patógena, *E. coli* F17 (EHEC), cuyos ratones inmunizados disminuyeron significativamente la carga bacteriana en heces durante los 8 posteriores días al desafío ($10^{3.7} - 10^{5.1}$ UFC/g) y mantuvieron la ganancia de peso, hasta $12 \pm 1.33\%$ del peso promedio inicial, posterior al desafío, mientras que el grupo control, tuvo una carga alta a los 4 (10^7 UFC/g) y 6 días ($10^{5.5}$ UFC/g) y redujeron la ganancia de peso significativamente durante 4 días posteriores al desafío, reduciendo hasta un $2.19 \pm 2.18\%$ del peso promedio inicial. Por lo tanto, BL21-F17+, podría ser considerado como un potencial candidato vacunal para la prevención de las diarreas en alpacas producidas por *Escherichia coli*.

Palabras claves: Vacuna, *Escherichia coli*, F17, EHEC, alpaca

ABSTRACT

Escherichia coli could cause diarrhea in young or baby alpacas producing deaths in complicated cases. The aim of the present study was to evaluate a recombinant vaccine in a murine model against enterohemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC). The pathotypes and fimbrial types of *E. coli* were detected genetically, from enteric and fatal cases isolated from alpacas, 42/226 (18.58%) were pathogenic isolates, (24/42) 57% have the gene of the fimbriae F17, whose adhesion subunit was inserted and expressed in BL21 (pET-9a). Immunogenicity of F17 and the Vector in alpaca PBMC were evaluated, the production of Th1/Th2 cytokines was elevated, high expression were predominantly INT- γ and IL-4. BALB/c mice were immunized orally with BL21-F17 +, blood and faeces were collected for the measurement of IgG and IgA antibodies, respectively, at 14, 28 and 42 days, higher levels of total IgG were detected (OD: 1.115); control (<DO: 0.53) with predominance of the subclasses IgG2a / IgG2b over IgG1, fecal IgA levels produced (OD: 1.206); control (<DO: 0.330) were significantly increased in the 3 evaluations. The evaluation of the vaccine efficiency were performed by challenging the mice immunized with a pathogenic strain, *E. coli* F17 (EHEC), immunized mice showed significantly decreased the bacterial shedding in feces during the 8 subsequent days at challenge ($10^{3.7}$ - $10^{5.1}$ CFU / g) and maintained the weight gain, up to 12 ± 1.33 % of the initial average weight after the challenge, while the control group had a high load at day 04 (10^7 CFU/g), day 06 ($10^{5.5}$ CFU/g) and reduced weight gain significantly during 04 days after the challenge, reducing to 2.19 ± 2.18 % of the initial average weight. Therefore, BL21-F17+, could be considered as a potential vaccine candidate for the prevention of diarrhea in alpacas produced by *Escherichia coli*.

Keywords: vaccine, *Escherichia coli*, F17, EHEC, alpaca

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. SDS-PAGE de la caracterización de la proteína recombinante F17 usando el plásmido pET-9a. .	50
Figura 2. SDS-PAGE de la caracterización de la proteína recombinante F17 usando el plásmido pET-28a	51
Figura 3. SDS-PAGE de la purificación de la proteína recombinante.	52
Figura 4. Western Blot usando un marcador anti histag.	53
Figura 5. Niveles de expresión relativa de INF- γ	54
Figura 6. Niveles de expresión relativa de TNF- α	55
Figura 7. Niveles de expresión relativa de IL-2	56
Figura 8. Niveles de expresión relativa de IL-4	57
Figura 9. Niveles de expresión relativa de IL-10	58
Figura 10. Cinética de expresión de anticuerpos IgG total en ratones BALB/c posterior a la inmunización	59
Figura 11. Cinética de expresión de anticuerpos IgG1 en ratones BALB/c posterior a la inmunización	60
Figura 12. Cinética de expresión de anticuerpos IgG2a en ratones BALB/c posterior a la inmunización	61
Figura 13. Cinética de expresión de anticuerpos IgG2b en ratones BALB/c posterior a la inmunización	62
Figura 14. Cinética de expresión de anticuerpos IgA en ratones BALB/c posterior a la inmunización	63
Figura 15. Eliminación en heces de la cepa de (EHEC) posterior al desafío, expresado en UFC/g en ratones BALB/c previamente inmunizados	65
Figura 16. Gráfico con la variación del porcentaje de peso durante la primera semana posterior al desafío en ratones BALB/c inmunizado	66

LISTA DE CUADROS

	Pág.
Cuadro 1. Secuencias y características de los cebadores utilizados para la determinación de genes de virulencia y de fimbrias de <i>Escherichia coli</i> .	35
Cuadro 2. Secuencias y características de los cebadores utilizados para las evaluaciones de citoquinas.	41
Cuadro 3. Concentraciones y condiciones para la RT-PCR	41
Cuadro 4. Concentraciones para la cuantificación relativa de la expresión de citoquinas mediante PCR en tiempo real.	42
Cuadro 5. Condiciones y ciclos para la cuantificación relativa de la expresión de citoquinas mediante PCR en tiempo real	42
Cuadro 6. Concentraciones para la cuantificación de UFC/g en heces de los ratones BALB/c mediante PCR en tiempo real.	46
Cuadro 7. Condiciones y ciclos para la cuantificación de UFC/g en heces de los ratones BALB/c mediante PCR en tiempo real.	46
Cuadro 8. Resultados de la presencia de genes de virulencia de <i>E coli</i>	49
Cuadro 9. Resultados de la detección de genes fimbriales asociados a patotipos de <i>Escherichia coli</i> .	50
Cuadro 10. Niveles de expresión relativa de INF- γ	54
Cuadro 11. Niveles de expresión relativa de TNF- α	55
Cuadro 12. Niveles de expresión relativa de IL-2	56
Cuadro 13. Niveles de expresión relativa de IL-4	57
Cuadro 14. Niveles de expresión relativa de IL-10	58
Cuadro 15. Medianas de las densidades ópticas a 450 nm de IgG total correspondiente a cada grupo experimental durante los primeros 42 días	59
Cuadro 16. Medianas de las densidades ópticas a 450 nm de IgG1 correspondiente a cada grupo experimental durante los primeros 42 días	61
Cuadro 17. Medianas de las densidades ópticas a 450 nm de IgG2a correspondiente a cada grupo experimental durante los primeros 42	62

	días	
Cuadro 18.	Medianas de las densidades ópticas a 450 nm de IgG2b correspondiente a cada grupo experimental durante los primeros 42 días	63
Cuadro 19.	Medianas de las densidades ópticas a 450 nm de IgA correspondiente a cada grupo experimental durante los primeros 42 días	64
Cuadro 20.	Medianas de los logaritmos en base 10 de las UFC/g en heces	65
Cuadro 21.	Pesos obtenidos por los ratones inmunizados posterior al desafío	66
Cuadro 22.	Pesos obtenidos por los ratones del grupo Control posterior al desafío.	66
Cuadro 23.	Valores en porcentajes muestran la media \pm SEM del porcentaje de ganancia/pérdida de peso	67

LISTA DE ABREVIATURAS

EPEC: *Escherichia coli* Enteropatógena

ETEC: *Escherichia coli* Enterotoxigénica

STEC/VTEC: *Escherichia coli* Productor de Shiga-Vero toxina

EHEC: *Escherichia coli* Enterohemorrágica

EAEC: *Escherichia coli* Enteroagregativa

EIEC: *Escherichia coli* Enteroinvasiva

BALB/c: Ratón albino de laboratorio

A/E: *attachment and effacement*, lesión de unión y borrado

LEE: *Locus enterocyte effacement*, genes para producir la lesión A/E

ST: Toxina termoestable

LT: Toxina termolábil

IgA: Inmunoglobulina A

IgG: Inmunoglobulina G

VHH: Dominio variable de la cadena pesada

PBMC: Células mononucleares de sangre periférica

Th: Linfocito T “helper” o colaborador

ADN: Ácido desoxirribonucleico

BCR: Receptor de Linfocito B

TCR: Receptos de linfocito T

UFC: Unidad formadora de colonias

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa

I. INTRODUCCION

Las enfermedades entéricas en el hombre y animales de granja son con frecuencia debido a la infección de agentes infecciosos, siendo la bacteria *Escherichia coli* uno de los microorganismos presentes en estas patologías, causando diarreas a través de cualquiera de sus patotipos: enterotoxigénica (ETEC), productores de toxina Vero o Shiga (VTEC o STEC), cuyo patotipo representativo es la enterohemorrágica (EHEC), enteropatógena (EPEC), enteroagregativa (EAaggEC) y enteroinvasiva (EIEC) (Bouckennooghe et al., 2002). De estos patotipos, en el hombre, ETEC es reconocido como uno de las causas más frecuentes de diarrea infantil en los países en desarrollo, y como un importante agente causal de la diarrea del viajero. Además, es una causa importante y global de diarrea acuosa grave en las crías de algunas especies animales como nacidos, lactantes y destetados en terneros y cerdos. (Nagy y Fekete, 1999).

La diarrea asociada a *Escherichia coli* es una importante enfermedad en crías de alpacas y llamas, cuya presentación está frecuentemente acompañada con una septicemia, crías afectadas presentan profusa diarrea acuosa, letargia, deshidratación y podría producir distensión abdominal (Whitehead and Anderson, 2006). En alpacas y llamas, se han desarrollado diversos estudios para la identificación de factores de virulencia asociados a los patotipos de *Escherichia coli* presentes. Así, se han descrito a los

patotipos EPEC, ETEC Y EHEC, como los más frecuentes, a partir de aislados de crías y adultos, tanto en casos de animales con diarreas (enfermos) y sin diarreas (Cid et al., 2012; Luna et al., 2012; Mori et al., 2014; Rosadio et al., 2012). A la vez, se ha descrito algunos serotipos fimbriales y su asociación con rotavirus en crías de alpacas con diarreas y en clínicamente sanos (Morales and Paredes, 2007).

La vacunación, sigue siendo una de las principales estrategias para la prevención de diarreas. Así, se han desarrollado diferentes tipos de vacunas contra *Escherichia coli* para diferentes especies, en base a células muertas o bacterinas de determinado serotipo fimbrial o somático, toxoides, y algunas vacunas recombinantes, contra determinados antígenos estructurales, hallándose diferente grado de protección (Cox et al., 2014). Entre las más difundidas y con mejores resultados obtenidos en bovinos y porcinos, son los orientados contra determinados serotipos fimbriales, ensayos con vacunas utilizando vectores bacterianos como *Salmonella*, bajo una expresión recombinante de antígenos fimbriales, permiten una potente protección al desafío con cepas patógenas en modelos murinos (Hur et al., 2012). Siendo los ratones, uno de los principales modelos para la evaluación de la patogénesis, y de vacunas dirigidos para diferentes especies, inclusive para humanos (Mohawk and O'Brien, 2011).

Por ello, el presente trabajo de investigación tuvo como objetivo el desarrollo de una vacuna contra *Escherichia coli* utilizando antígenos fimbriales dirigidos contra los tipos fimbriales de mayor frecuencia reportada en alpacas. Cuya proteína fimbrial se expresará en otra bacteria, que será utilizada como vector. Esta vacuna, será administrada por vía oral en ratones BALB/c para su posterior evaluación de la respuesta inmune, a través de la medición de anticuerpos y posterior desafío con una cepa patógena. A la vez se medirá la respuesta inmunológica al antígeno *in vitro*, cuantificando los niveles relativos de las interleucinas de la respuesta inmune celular en linfocitos de alpacas y ratones, respectivamente.

II. ANTECEDENTES

2.1 SANIDAD EN CRÍAS DE ALPACAS

2.1.1 La alpaca

Los camélidos en base a su biogeografía se han clasificado en dos tribus Camelini (ubicados en Africa y Asia) y Lamini (Sudamérica) (Linnaeus, 1758; Nowak, 1191). Los camélidos sudamericanos están conformados por dos géneros: *Vicugna* (vicuña) y *Lama* (guanaco), y sus especies domesticadas son la alpaca y la llama (*Vicugna pacos* y *Lama glama* (Kadwell et al., 2001). Sin embargo, estos esfuerzos para la clasificación, y principalmente en la determinación del origen de la alpaca, han tenido grandes dificultades debido a los altos índices de hibridación entre alpacas y llamas, con niveles mayores al 80%, que inclusive, en un estudio en Canchis, provincia de Cusco, alcanzó un 92% de hibridación (Kadwell et al., 2001; Wheeler, 2006).

Las alpacas son animales con una vida productiva media de 14 años, aunque viven más de 20 años, con un periodo de gestación entre 10 a 14 meses, generalmente paren a una sola cría. Las alpacas adultas, en referencia a la cruz, alcanzan una altura cercana al metro con un peso promedio de 50 kilos (Cid, 2010).

Las alpacas poseen un sistema digestivo similar a los tradicionales rumiantes con 04 cámaras. Sin embargo, los camélidos, son llamados “pseudorumiantes”, con tres distintos compartimentos anatómica-funcionales, denominados C1, C2 y C3. C1, es el compartimento más largo y es similar al rumen de los bovinos; C2, tendría funciones compatibles al retículo y abomaso de rumiantes. Mientras que el tercer compartimento es considerado el estómago “verdadero”, funcionalmente similar al abomaso de los rumiantes, como al de los monogástricos, produciendo ácido clorhídrico. Entre otras características resaltantes, los camélidos poseen una prominente ampolla duodenal, y ausencia de vesícula biliar (Fowler, 1998).

2.1.2 Producción de Alpacas en el Perú

Perú es el principal productor fibra de alpaca a nivel mundial, con una producción de 4, 501 toneladas anuales. Además, el Perú posee la mayor población de alpacas a nivel mundial, superando a otros países de la región como Bolivia y Chile, con una cantidad aproximada de 3,8 millones correspondiente a un 87% de la población mundial de alpacas. Las regiones con mayor población de alpacas a nivel nacional son Puno y Cusco (1,45 y 0.5 millones), las regiones Arequipa, Huancavelica y Ayacucho complementan considerablemente la población alpaquera nacional (INEI, 2012; MINAGRI, 2017).

Su crianza y producción se realizan principalmente en las zonas altoandinas de nuestro país, siendo una de las principales actividades económicas y de subsistencia de los pobladores altoandinos a través de la comercialización de fibra y carne, como principales productos. Teniendo la fibra un potencial comercial debido a su fina textura; mientras que la carne, posee características como una carne saludable al poseer niveles bajos de grasas y altos en proteínas. Sin embargo, su producción no es eficiente debido a la falta de pasturas de calidad y la alta carga animal, inadecuado manejo y selección de animales con deficiencias en la sanidad, siendo producida por pequeños y medianos productores principalmente, mientras que, en menor proporción se han formado empresas o asociaciones, en las que se puede observar un mejor manejo, optimización de recursos y control sanitario (Cid, 2010).

2.1.3 Sanidad de neonatos en alpacas

La producción de camélidos sudamericanos disminuye su productividad al ser afectado por diversas enfermedades infecciosas que producen altas tasas de mortalidad y morbilidad, siendo los neonatos el grupo más afectado. Agentes infecciosos, como los parásitos influyen negativamente en el potencial genético de los animales, afectando la productividad, reduciendo la calidad del fibra y la carne (Fernández-Baca, 1991).

Las enfermedades infecciosas en las alpacas presentan altas tasas de mortalidad y morbilidad, que inclusive producen la muerte en animales jóvenes, de las cuales se han definido etapas: los primeros -7 días corresponden a la muerte perinatal; desde los 7 hasta el primer mes, la denominada mortalidad neonatal y se reportan mortalidades de crías jóvenes desde el primer mes hasta el medio año de vida. Se ha reconocido que la mayor mortalidad ocurre durante la etapa neonatal, siendo críticos los primeros 30 días de edad. La mortalidad está causada por factores ambientales y/o manejo inadecuado durante los 4 primeros días, y la mortalidad de la primera semana al primer mes son producidas principalmente por agentes infecciosos (Fernández-Baca, 1991; Rosadio et al., 2012).

La principal causa de mortalidad en las crías de alpacas son causadas por agentes infecciosos, cuyo factor predisponente es considerado, la deficiencia de la transferencia de la inmunidad pasiva, obtenida por las crías a través del calostro de las madres, el éxito de la transferencia de la inmunidad se refleja en la concentración de inmunoglobulinas, que le confieren protección y mejores probabilidades de supervivencia (Garmendia and McGuire, 1987). Esta disminución del paso de inmunoglobulinas o transferencia de la inmunidad pasiva en alpacas se debe al tipo de placenta que poseen, el cual es epiteliocorial difusa (Ameghino and DeMartini, 1991).

Existen enfermedades de mayor importancia debido a la frecuencia con las que atacan a las alpacas, las cuales producen altos índices de mortalidad, entre ellas se describen: a la enterotoxemia como unas de las más importantes, seguida de la Diarrea Neonatal, infecciones respiratorias agudas fatales y las septicemias. Las estrategias para poder prevenir y controlar las enfermedades arriba descritas son claves para una optimización de la productividad de los animales y de su

conservación genética (Cid et al., 2012). Si bien, las enfermedades actualmente se consideran la interacción de más de un microorganismo infeccioso, denominados complejos, tanto respiratorio y entéricos, a continuación se describen conceptos individuales para una mejor descripción de las enfermedades.

2.1.3.1 La Enterotoxemia

El agente infeccioso es una bacteria grampositivo, anaerobio, en forma de bacilo denominado *Clostridium perfringens*, el cual posee la capacidad de producir toxinas, en el ambiente tiene la capacidad de formar esporas, la cual es una estructura altamente resistente, está distribuida en diferentes nichos ecológicos, inclusive forma parte de la microbiota normal del intestino, tanto en el hombre como en los animales (Cid, 2010). En el lumen intestinal son producidas las toxinas que van a alterar la permeabilidad de la pared intestinal, lo que produce una acumulación de electrolitos y fluidos en el lumen, para luego ser absorbidas las toxinas al torrente sanguíneo (Ramírez, 1991).

La presentación clásica de la enfermedad, y considerada como único signo clínico, es la muerte súbita. En menor frecuencia o en casos raros se muestran signos como depresión, postración y debilitamiento, anorexia, mantienen las orejas hacia atrás y los miembros extendidos. Posteriormente, el abdomen se distiende, la cabeza es apoyada en el suelo, no respiran adecuadamente y emiten quejidos. Prosigue con alteraciones nerviosas en las que se observan convulsiones y el cuadro sistémico final produce opistótonos que antecede a la muerte. En la mayoría de los casos reportados no se ha observado diarrea como signo que acompañe o propicie esta patología (Perez, 2006; Ramírez et al., 1998).

En los hallazgos histopatológicos por un cuadro enterotoxémico se ha descrito intestinos congestionados y hemorrágicos, con placas de Peyer inflamadas. Algunos ganglios, como los mesentéricos principalmente, se incrementan de tamaño, y se muestran con congestión y hemorrágicos, lesiones similares se evidencian en la mucosa del estómago glandular. Otros órganos, como el hígado también presentan congestión y toma un aspecto amarillento lo que sugiere una degeneración grasa. El sistema respiratorio también es afectado, en el pulmón, en muchos casos, se observa edema y congestión. Así, las alteraciones multiorgánica está asociado a un cuadro septicémico (Ameghino and DeMartini, 1991; Ramírez

et al., 1998). A nivel histológico, la enteritis necrótica es la lesión de mayor hallazgo en las porciones de duodeno, yeyuno e íleon (Palacios et al., 1999).

2.1.3.2 Diarrea neonatal

Los agentes infecciosos que pueden producir las diarreas neonatales son microorganismos, como las bacterias, los virus y los parásitos. Entre los microorganismos patógenos, se encuentran a los rotavirus, coronavirus, algunos patotipos de *Escherichia coli*, *Cryptosporidium spp.*, *Giardia spp.* y coccidias (Cid et al., 2012).

Los signos clínicos incluyen principalmente diarreas, deshidratación progresiva que los postra, el animal deja de alimentarse y consumir agua, se deprimen y finalmente mueren. Sin embargo, se ha reportado que algunas crías pueden recuperarse. No obstante, los animales que son afectados y se recuperan suelen disminuir su potencial desarrollo, mostrándose débiles y susceptibles a otras enfermedades (Fernández-Baca, 2005).

El principal factor de riesgo asociado a la presentación de diarreas en neonatos es el mal manejo de las heces que contaminan los pastos y el lugar de descanso de los animales, en la cual, se incrementan los niveles o cargas de las cepas patógenas de *Escherichia coli* y otros enteropatógenos. Además, la deficiencia de la nutrición en las madres disminuye su estatus inmunitario reflejándose en la deficiencia del calostro, de gran importancia en las crías. (Cebra et al., 2003; Rosadio and Ameghino, 1994).

Las lesiones varían en la severidad y los tipos de inflamación, dependiendo del agente infeccioso o el complejo que produce la diarrea, y frecuentemente se ha reportado la acumulación de líquidos en intestinos mostrándose dilatados (Cid et al., 2012; Palacios et al., 1999).

2.2 ESCHERICHIA COLI

2.2.1 Biología de *Escherichia coli*

El microbiólogo de origen alemán, Theodor Escherich quien estudiaba la microbiota intestinal de niños, descubrió una bacteria de fácil crecimiento, denominándola “*Bacterium coli commune*”, ahora mundialmente conocida como

Escherichia coli. Los estudios de muchos investigadores han conllevado a reconocer la importancia de esta bacteria en el ámbito de la salud, en la industria química y alimentaria. Además, debido a su versatilidad metabólica, fácil crecimiento y el reconocimiento de su biología genética lo ha posicionado como la bacteria de elección en la industria de la biotecnología produciendo más de 500 billones a la economía global anualmente. (Blount, 2015).

Escherichia coli es un bacilo gramnegativo de 1 µm de longitud y 0.35 µm de ancho, anaerobio facultativo no exigente, con un crecimiento óptimo en Agar MacConkey a 37 C, en el cual fermentan la lactosa produciendo colonias de color rosadas, y entre otras características bioquímicas generales, muestran una positividad al indol, no utilizan el citrato como fuente de carbono y son negativos a las pruebas de ureasa y sulfuro de hidrógeno. Además, poseen estructuras como pilis para su adhesión y flagelos para el movimiento. Filogenéticamente han sido clasificados miembros de los Enterobacteriaceae relacionado a bacterias como *Salmonella*, *Klebsiella*, *Serratia* y *Yersina*. (Blount, 2015; Gyles et al., 2011).

2.2.2 Características genéticas y diversidad de *Escherichia coli*

Se han realizado secuenciamientos genéticos de una gran cantidad de cepas de *Escherichia coli*, determinándose que poseen un genoma base de 2200 genes, pero el análisis pangenómico indica que pueden poseer aproximadamente hasta 13000 genes. Así, las *Escherichia coli* comensales poseen la menor cantidad o carga genética, habiendo diferencias de por lo menos 1 Mb frente a los patógenos. Un aislado promedio de *Escherichia coli* posee 4,500 000 pb y 5000 genes, que indica más del doble de los genes básicos, encontrándose una diferencia sustancial e importante entre ellas, la cual las hace tan diversas fenotípicamente. Además, los mecanismos de transferencia genética que se conocen en bacterias han sido descubiertas en este género bacteriano, el mecanismo de transferencia genética horizontal ha permitido la adquisición e intercambio de genes, ya sean de grandes paquetes genéticos de virulencia como son las Islas de Patogenicidad (IP), las cuales no poseen la *Escherichia coli* comensales o no patógenas, las IP están flanqueadas por elementos genéticos móviles como las secuencias de inserción y transposones, cercanos a genes de ARN de transferencia, los cuales a la vez pueden ser transferidos mediante plásmidos y profagos (Croxen and Finlay, 2010).

2.2.3 Mecanismos de patogenicidad y factores de virulencia de *Escherichia coli*

Escherichia coli, es una bacteria comensal y parte de la microbiota intestinal del hombre y animales. Sin embargo, la adquisición de genes de virulencia, como adhesinas, invasinas, proteasas, toxinas, etc., ha generado cepas con determinada capacidad de producir patrones lesionales, clasificándose en patotipos, los cuales también poseen un patrón genético distinto entre ellos, los cuales a continuación se describen:

2.2.3.1 *Escherichia coli* Enteropatógena (EPEC)

La denominada lesión de adherencia y borrado (A/E, *attachment and effacement*), es caracterizada por una inicial adherencia de *Escherichia coli* a las células intestinales y a través, de moléculas efectoras, invasinas, alteran el citoesqueleto celular debido a una polimerización desordenada de la actina, lo cual produce una deformación en forma de pedestal a nivel la superficie apical del enterocito, borrando las microvellosidades, dejándola sin la capacidad de absorción. Esta capacidad de inducir la lesión A/E, está codificada por genes en una Isla de Patogenicidad denominada LEE (*Locus enterocyte effacement*), al cual codifica un sistema de secreción tipo III, tir e intimina (Croxen et al., 2013; Kaper et al., 2004).

2.2.3.2 *Escherichia coli* Enterotoxigénica (ETEC)

Es el causante de la diarrea acuosa, asociado principalmente en niños en países en desarrollo y es el causante de la diarrea del viajero. ETEC, coloniza el epitelio intestinal, favorecida por las algunas adhesinas fimbriales (F4, F5, F6, F17, F41), las cuales solo están presentes en animales; en humanos, están implicadas adhesinas como son los factores de colonización (FC), antígenos asociados a la colonización (CFA) y otras adhesinas no fimbriales. Posterior a la colonización, ellos tienen la capacidad de producir toxinas, toxina termolábil (LT) y la toxina termoestable (ST), las cuales pueden ser producidas independientemente o ambas a la vez, cuyas toxinas están relacionadas en estructura y función a enterotoxina expresadas por *Vibrium cholerae*, cuyas toxinas incrementan los niveles de AMPc y/o GMPc intracelular en los enterocitos los que altera el balance de electrolitos, además pueden incrementar la síntesis de prostaglandinas que estimulan el sistema

nerviosos entérico conllevado a una estimulación de la secreción e inhibición de la absorción (Croxen and Finlay, 2010; Kaper et al., 2004).

2.2.3.3 *Escherichia coli* productora de Shiga Toxina (STEC)

Poseen los genes para producir Shiga toxina 1 o Shiga toxina 2 (*stx1* o *stx2*) las cuales también son denominadas Verotoxinas por su acción en las células Vero, las cuales son adquiridas a través de fagos. Esta toxina consta de 5 subunidades B que permiten la unión a su receptor celular Gb3; y la subunidad A, que corta el ARN ribosomal interrumpiendo la síntesis proteica, de las células que afecta. Además, puede estar acompañada de genes LEE, existiendo diferencias en la patogénesis y virulencia de los más de 400 serotipos, de los cuales, uno de ellos posee la capacidad de producir un Síndrome Urémico Hemolítico, el cual es conocido como *Escherichia coli* Enterohemorrágico (EHEC) cuyo serotipo O157:H7 ha sido causante de varios brotes mortales a nivel mundial, en el cual se ha identificado a los bovinos como reservorios de este patotipo de gran impacto en la salud pública (Croxen et al., 2013; Kaper et al., 2004).

2.2.3.4 *Escherichia coli* Enteroagregativa (EAEC)

La principal característica histopatológica de este patotipo es la presencia de una capa gruesa de bacterias en la superficie de las células epiteliales del colon, que se superponen unas a otras. Esta característica es producida debido a la expresión de genes que producen estructuras fimbriales, denominadas fimbrias de adherencia agregativa (AFFs), las cuales tienen hasta cuatro variedades y pertenecen a la familia de adhesinas Dr. Posterior a la colonización, se ha determinado que pueden producir diferentes toxinas, las cuales están en estudio y han sido implicadas en la dispersión y penetración de la capa de la mucosa, que conjuntamente con una flagelina inducen una respuesta inflamatoria, agregación de neutrófilos, alterando la homeostasis, pérdida de absorción, descamación celular e incremento del peristaltismo, produciendo diarreas (Croxen and Finlay, 2010; Kaper et al., 2004)

2.2.3.5 *Escherichia coli* Enteroinvasiva (EIEC)

El presente patotipo está relacionado a *Shigella*, debido a su mecanismo patogénico intracelular. Además, *Shigella* y EAEC, son taxonómicamente indeferenciabiles y recientes análisis filogenéticos han demostrado que *Shigella* pertenece a *Escherichia coli*. Sin embargo, por su importancia histórica y epidemiológica aún se considera como *Shigella*. El mecanismo de patogenicidad está asociado a los plásmidos que contienen genes para un Sistema de Secreción tipo III, y las proteínas IpaA, IpaB, IpaC e IpgD, moléculas efectoras que van a inducir cambios en el citoesqueleto de los enterocitos o las células epiteliales afectadas, cuya deformación y proyección permiten el ingreso dentro de una vacuola, en la cual se multiplican, lisan la vacuola e infectan otras células adyacentes, alterando el funcionamiento e induciendo a la apoptosis a las células que infecto (Croxen et al., 2013; Kaper et al., 2004).

2.2.3.6 *Escherichia coli* de Agregación Difusa (DAEC)

El patotipo DAEC, se caracteriza por tener adhesinas Dr y adhesinas afimbriales (Afa), que colectivamente se denominan, Dr/Afa adhesinas, las cuales le permiten colonizar los enterocitos o células epiteliales con una característica particular, mostrando en la monocapa celular HEp-2, una adhesión desordenada, la cual es denominada de Agregación Difusa. Las adhesinas de DAEC tienen como receptor a DAF (*decay-accelerating factor*), que posterior a una cascada de señalizaciones intracelulares induce un rearrreglo desordenado del citoesqueleto, produciendo proyecciones en las células con borde en cepillo, el cual permitirá la adhesión difusa de más bacterias de este patotipo, a la vez, el reconocimiento de este agente infeccioso por el sistema inmune innato induce la producción de citoquinas proinflamatorias y atracción de neutrófilos que en su conjunto generan inflamación. Así, este patotipo puede colonizar intestino delgado en niños, en el cual produce profusas diarreas y también se han aislado en infecciones del tracto urinario, produciendo infecciones urinarias en adultos (Croxen et al., 2013; Croxen and Finlay, 2010; Kaper et al., 2004).

2.2.4 Fimbrias de *Escherichia coli*

Uno de los primeros factores de virulencia en la patogénesis de *Escherichia coli*, son las adhesinas que les permite asentarse en la célula blanco, colonizar y

posteriormente eliminar toxinas o proteínas efectoras que alteran el funcionamiento normal de las células de la mucosa intestinal. Entre las adhesinas más representativas son las de tipo fimbrial, en las que se ha reportado principalmente a las fimbrias F4, F5, F6, F17, F41, F18, siendo asociadas a los patotipos Enteropatógenos (EPEC), y con mucha más frecuencia a los enterotoxigénicos (ETEC), en porcinos, la fimbria F18 esta asociada a los *E coli* productores de Shiga toxina (STEC) (Nagy y Fekete, 1999). Sin embargo, estos patrones han mostrado variaciones particulares tanto en aves como en bovinos, teniendo cepas con combinaciones de factores de virulencia, tanto adhesinas como fimbrias de diferentes patotipos. Así, se ha reportado a la fimbria F17, como uno de los factores de virulencia de mayor importancia, debido a la detección genética de esta adhesina en cepas o aislados de *E coli*, productores de diarreas en ternero, realizándose diversos estudios, en lo que se ha determinado que F17 es una familia de fimbrias y que sus variedades están asociados como principal adhesina de muchos patotipos, inclusive los Necrotoxigénicos (NTEC) de reciente clasificación y los enterohemorrágicos (EHEC), cuya estructura fimbrial se compone de una base que es la proteína estructural mayor “A”, mientras que la proteínas estructural menor que tiene función de interacción o adhesión es la “G” (Bihannic et al., 2014). Por ello, las fimbrias han servido como candidato vacunal contra *E coli*, para la inmunización de diferentes especies (Francis and Willgoths, 1991; Luna-Pineda et al., 2016; Tiels et al., 2008; Zhang et al., 2018).

2.2.5 *Escherichia coli* en animales

Escherichia coli es una de las bacterias con mayor presencia en la microbiota de los animales, encontrándose en las heces en cantidades de 10^7 a 10^9 unidades formadoras de colonias por gramo (UFC/g), a excepción de mascotas aviares sanas con cantidades bajas. *Escherichia coli*, coloniza el tracto intestinal de animales recién nacidos de la microbiota de la madre y del ambiente, estableciéndose como comensal en la microbiota del recién nacido, en concentraciones bajas en el intestino delgado pero incrementándose progresivamente con cantidades elevadas en las porciones distales del intestino grueso, sin causar lesiones o enfermedades. Sin embargo, existen una menor población de *Escherichia coli* con una variada característica genética que le permiten poseer diversos factores de virulencia y mecanismos de patogenicidad,

que bajo ciertas pueden causar diversas enfermedades, desde lesiones focalizadas hasta enfermedades sistémicas (Gyles et al., 2011).

Entre las enfermedades de mayor impacto en animales que produce *Escherichia coli* se han descrito a la Diarrea Neonatal, en porcinos y bovinos. A la vez, otra enfermedad de gran importancia en la industria porcina es la Diarrea postdestete. En otras especies, como el perro, conejo y ovinos, también producen diarreas, principalmente en animales de edades tempranas. Todas estas enfermedades entéricas están asociadas principalmente a los patotipos Enteropatógenos (EPEC) y Enterotoxigénicos (ETEC), mientras que en la enfermedad de los edemas que afecta a los cerdos se ha identificado cepas productoras de Shiga toxina (STEC) (Bouzari et al., 2012).

Existen un grupo de cepas de *Escherichia coli* con capacidad de colonizar e invadir otros tipos de tejidos u órganos y hacerse septicémicos, a pesar de tener un origen entérico, siendo denominadas Extraintestinales. En bovinos y cerdos, *E. coli*, puede producir mastitis, en el cual actúa como oportunista, otra *E. coli* invasiva afecta terneros hipogamaglobulinémicos y porcinos con deficiencias inmunitarias produciendo septicemias, en los cuales están asociados los serotipos O11, O78, O101, O115 Y O119. En perros y gato, están asociados a enfermedades de la uretra, producen piometra y en asociación con otros patógenos primarios pueden diseminarse en la sangre. Afecta a los aves como los pollos produciendo infección del saco vitelino, producen celulitis, el Síndrome de la cabeza hinchada, Aerosaculitis asociado a septicemias, en esta última enfermedad los serogrupos de mayor hallazgo fueron O1 , O2 y O78 (Gyles et al., 2011).

2.2.5.1 *Escherichia coli* en Alpacas

Escherichia coli ha sido aislado, tanto en humanos y en diferentes especies en las que se han estudiado, en las alpacas se han realizado aislamientos de animales sanos a partir de muestras fecales, se han encontrado como único agente y formando complejos, en patologías entéricas, y en menores casos en procesos sistémicos:

En la Patagonia de Argentina, en guanacos presentaron un cuadro diarreico verdusco del cual aislaron cepas de *Escherichia coli* que poseían genes *eae* y *stx1*, que infectaban células Vero, perteneciendo al patotipo STEC serotipado como O26:H11 (Mercado et al., 2004).

La búsqueda de detección de genes asociados a STEC, se determinó en crías de alpacas de 1 a 2 meses de edad con cuadros diarreicos en Perú, hallándose cepas de *Escherichia coli* con la presencia de genes *stx1*, *stx2* y *eae*, en un 5,7 , 19 y 17 % respectivamente de un total de n= 158 (Bravo de Rueda, 2006).

En Inglaterra, la evaluación histológica, en tres crías de alpaca con problemas entéricos, a las cuales se les había aislado *Escherichia coli*, mostraron el patrón de lesión de adhesión y borrado, compatible con patotipos diarreogénicos (Foster et al., 2008).

En cuadros entéricos en crías de alpacas en Perú, los microorganismos determinados fueron *Escherichia coli* y rotavirus, a la vez, se evaluaron las fimbrias y la asociación de determinado patotipo fimbrial de *Escherichia coli* con rotavirus, hallándose un predominio del biotipo *Escherichia coli* F41 y rotavirus como causantes de diarrea en crías de alpaca (Morales and Paredes, 2007). Se han realizado la detección de genes de virulencia de *Escherichia coli* en nuestro país, un estudio valió presencia genes asociados a los patotipos Enterotoxigénicos, Enteropatogénicos y Enterohemorrágicos en aislados de crías de alpacas de la región Puno a partir de muestras fecales, tanto en animales sanos, animales con diarreas y de casos entéricos fatales, hallando un 58% de cepas potencialmente patógenas con genes asociados a EPEC (80%) y productores de shiga toxina EHEC (20%) (Luna et al., 2012). Otro estudio similar, en el cual se incluyeron algunos que permiten la adhesión, obtuvieron resultados a partir de 303 aislados de *Escherichia coli*, del cual 39 (12.88%), poseían al menos un gen de virulencia asociado a algún patotipo diarreogénico, con 23 cepas productoras de shiga toxina (STEC) y 16 asociados a EPEC (Mori et al., 2014). La evaluación en 6 centros de producción de alpacas de Puno, también mostró resultados similares, predominando el patotipo EPEC, y en menor proporción las cepas de *Escherichia coli* productoras de vertotoxinas (1 y 2) (Cid et al., 2012). Otros estudios microbiológicos recientes, han determinado mediante el aislamiento la presencia en casos de diarrea como únicos agentes y acompañados o en complejos con parásitos como las eimerias y agentes virales, rotavirus y coronavirus (Rojas et al. 2016; Lucas et al. 2016; Barrios-Arpi et al. 2016).

2.3 INMUNIDAD DE ALPACAS

Los primeros estudios de mayor impacto sobre la inmunología básica en camélidos estuvieron enfocados en la particularidad del tipo de anticuerpos que poseían, tanto en camélidos del viejo y del nuevo mundo. Así, en el Año 1993, tras la evaluación de purificación de anticuerpos sanguíneos como parte de un proyecto estudiantil, notaron que las proteínas que se obtenían poseían diferentes pesos a los convencionales en humanos y otros mamíferos, determinándose que los camellos poseían inmunoglobulinas G, que poseían la cadena pesada con una bisagra prolongada unida a solo una fracción variable de la región de unión al antígeno, y la ausencia de la cadena ligera, los cuales son llamados anticuerpos de cadena pesada con dominio variable (VHH), cuya característica corresponderían a los subclases IgG2 e IgG3, mientras que IgG1 corresponden a un anticuerpo convencional (Hamers-Casterman et al., 1993). Posterior a ello, se determinó la presencia de anticuerpos IgM e IgA en camellos. En Llamas se han descrito subclases de anticuerpos IgG1a, IgG1b, IgG2a, IgG2b e IgG3, este último corresponde a un anticuerpo VHH, los anticuerpos convencionales tendrían funciones y característica similares a los de otras especies como son los caballos, bovinos, ovinos, caprinos y cerdos (Wernery, 2001). Si bien, los estudios mencionados anteriormente, describen la capacidad de producir anticuerpos, incluyendo las distintas subclases, la alpacas poseen un tipo de placenta microcotilodenaria epitelio-corial, el cual permite una transferencia de anticuerpos IgG maternos a las crías, dentro de las 24 horas, reportándose la falla en la transferencia, resultando en niveles séricos bajos de IgG en alpacas durante las primeras semanas, que lo hace susceptible a diversas enfermedades infecciosas (Bravo et al., 1997; Maximiliano G. et al., 2018a; Wernery, 2001)

2.3.1 Células del Sistema inmune de la alpaca

La presencia de animales jóvenes con mayor susceptibilidad a diferentes agentes infecciosos en llamas, reportado por diferentes centros de producción de varios países condujo a la sospecha de una posible deficiencia inmune en animales jóvenes. Por ello, se realizó una evaluación del perfil celular inmune en sangre periférica, tanto en animales adultos (1 a 8 Años) y animales jóvenes (menores a 1 año) en llamas. Esta caracterización de células mononucleares de sangre periférica (PBMC), mediante la evaluación con Citometría de Flujo utilizando anticuerpos monoclonales heterólogos, los cuales serían extrapolables a la alpacas por su relación genética según los investigadores, determinó patrones en la llama muy

similares a los de animales adultos en otras especies como los bovinos o rumiantes, hallándose en promedio células B (37%), células T $\alpha\beta$ (27%) y T $\gamma\delta$ (16%), monocitos (5-16%), a la vez, se determinó la presencia de plaquetas y polimorfonucleares. Sin embargo, en animales jóvenes, la población de Linfocitos B era relativamente alta (43%), en comparación a otras especies como los bovinos, caprinos y ovinos. Mientras que, los animales jóvenes que padecían del Síndrome de Inmunodeficiencia juvenil mostraron niveles extremadamente bajos de Células B (1-5%), cuya deficiencia fue atribuida a una alteración genética autosomal recesiva (Davis et al., 2000).

2.3.2 Respuesta Inmune en Alpacas

Se han realizado diversos estudios en cual se ha descrito algunas características de la respuesta inmune de las alpacas, estudios enfocados en la búsqueda de información básica que conlleven principalmente a estrategias para la prevención de la enterotoxemia. Así, se ha realizado la descripción anatómica y funcional de las placas de Peyer, células de Paneth y células que conforman el intestino delgado en crías de alpacas (Boris Lira et al., 2012; Roca L. et al., 2014).

La inmunidad innata de las alpacas, en cuanto a su detección genética y expresión de niveles de péptidos antimicrobianos en células epiteliales fue descrita determinándose dos tipos de defensinas (alfa y beta) que eran expresadas desde los primeros días de nacidos en las alpacas (More B. et al., 2012), posterior a ello, se evaluó las diferencias de la expresión de las (alfa y beta) defensinas en animales sanos y enfermos de crías de alpacas menores a 45 días, determinándose que los animales con enteropatías producen una mayor expresión en comparación a los animales sanos de ambas defensinas (Siuze et al., 2015).

Los niveles de expresión relativa de Factor de Necrosis Tumoral alfa (TNF- α) e Interleucina 1 alfa (IL- α) a nivel de yeyuno, mostraron ser más altos en animales con procesos infecciosos entéricos que en animales aparentemente sanos, en crías de alpaca las cuales fueron comparados por semanas, mostrando la misma tendencia (Bardález C. et al., 2013). Relacionado a la respuesta de citoquinas y complementario al estudio mencionado previamente, se midieron los niveles de expresión relativa de los genes de las citoquinas IL-10 y TGF- β en los animales clínicamente sanos, lo que demostró un cinética creciente relacionado a los días de edad de las crías de alpacas, mostrando la capacidad del sistema inmune intestinal

o relacionado a mucosas, el cual puede inducir citoquinas inflamatorias y citoquinas que regulen las respuestas o mantengan la homeostasis intestinal (Burga C. et al., 2017).

Evaluaciones *in vitro*, para medir la capacidad de la respuesta inmune de células linfoides obtenidas de sangre periférica, cuantificaron los niveles relativos de las citoquinas asociadas a los perfiles de Th1 y Th2, frente a antígenos clostridiales (Raquel Watanabe et al., 2014; Tambillo G. et al., 2014), con similar respuesta, con tendencia a una respuesta Th2, se determinaron usando células mononucleares de sangre periférica desafiados a una proteína recombinante de *Pasteurella multocida* (Maximiliano G. et al. 2018).

La respuesta humoral también fue cuantificada, específicamente de IgA en crías de alpacas, cuyos niveles de expresión relativos fueron ascendentes en relación a la edad en animales aparentemente sanos, mientras que los niveles en animales con enteropatías fueron siempre superiores. Además, se determinó la capacidad estimulante de la L-glutamina, induciendo una mayor expresión de IgA a nivel intestinal (Bejarano L. et al., 2017; Córdova, 2012).

2.4 CONCEPTOS BÁSICOS DE VACUNACIÓN

Vacunación es el proceso por el cual se administra intencionalmente, uno de los componentes estructurales, varios, microorganismo completo o moléculas asociadas a un agente patógeno para el cual se pretende inmunizar o conferir resistencia a través de la respuesta inmune (Tizard, 2013). Esta práctica, desde sus inicios de manera empírica, ha permitido la protección frente a diversas enfermedades que mermaban drásticamente la población humana y animal. Que, a través del desarrollo de la microbiología, la genética y biotecnología, se han producido diferentes tipos de vacunas, simples por su elaboración como son las vacunas inactivadas o muertas, hasta las vacunas conjugadas sintéticas (polisacáridos-proteínas), a continuación se describen conceptos básicos sobre la vacunación:

2.4.1.1 Vacuna

El término vacuna proviene del latín “*vacca*”, debido a que Edward Jenner, observó que las ordeñadoras de vacas, que poseían lesiones en las manos, eran inmunes a la viruela, las llagas de las ordeñadoras al ser inoculadas en la piel de

otras personas conferirían resistencia a esta enfermedad, teniendo un factor protector. Actualmente, se comprende que una vacuna, es aquel preparado biológico derivado de microorganismos que producen inmunidad contra una enfermedad (Smith, 2011; Tizard, 2013).

2.4.1.2 Inmunización Activa

La inmunización activa se genera cuando se vacuna a un individuo o animal, el cual responde a través de la generación de una respuesta inmune adaptativa, la cual produce células de memoria y anticuerpos, esta respuesta requiere de días a semanas, pero una vez establecida puede durar meses hasta muchos años o de por vida. Una exposición natural a determinado microorganismo, de la misma forma, genera este tipo de respuesta. Por ello individuos o animales que resistían a ciertas enfermedades infecciosas, usualmente mortales, se mantenían protegidos ante nuevos brotes (Baxter, 2007).

2.4.1.3 Inmunización Pasiva

La inmunidad pasiva se refiere al proceso por el cual a un individuo o animal se le transfiere células inmunes y/o anticuerpos principalmente, para conferirle protección frente a determinada enfermedad. La cual puede clasificarse como natural o adquirida, la inmunidad pasiva natural es la que se produce cuando la madre transfiere inmunidad a la cría a través de la placenta o mediante el calostro; mientras que, la inmunidad pasiva adquirida, es la transferencia de sueros con gran cantidad de anticuerpos proveniente de individuos inmunizados. Sin embargo, la inmunidad pasiva, tiene una duración relativamente corta, de semanas hasta 3 o 4 meses como máximo, puesto que estas inmunoglobulinas se degradan (Baxter, 2007; Tizard, 2013).

2.4.1.4 Tipos de Vacunas

2.4.1.4.1 Toxoides

La vacuna de tipo toxoide es aquella que se obtiene de la inactivación o alteración mediante procesos físico-químicos de determinada toxina, la cual pierde su actividad tóxica por alteración de algunos aminoácidos, pero que permite al sistema inmune ejercer una respuesta, especialmente por anticuerpos, para neutralizar en una posterior exposición a la toxina activa o

nativa. Usualmente se realiza cultivando la cepa toxigénica, se induce su expresión de la toxina, y posterior a ello, obtiene el sobrenadante, y se trata con formaldehído, lo cual altera la toxina y la convierte en toxoide, finalmente se purifica (Baxter, 2007).

2.4.1.4.2 Vacunas muertas o inactivadas

Las vacunas muertas o inactivadas son productos biológicos obtenidos de una alteración química en los microorganismos, conllevando a un cese de su función o metabolismo, que al ser inoculados permiten una protección frente al microorganismo al cual se ha inmunizado, siendo denominado en bacterias, vacunas muertas; mientras que, en virus, se le denomina inactivación. La formalina, es el compuesto químico de mayor uso, lo que permite que la mayoría de las estructuras de los microorganismos se conserven, similar a los toxoides, son vacunas seguras, que permiten un amplio margen de dosificación. Sin embargo, al inmunizar el microorganismo completo, el sistema inmune reconoce muchos antígenos lo cual disminuye la capacidad de respuesta potencialmente eficiente frente a determinado microorganismo, siendo necesario refuerzos o dosis vacunales a determinado tiempo, para obtener respuestas óptimas (Baxter, 2007; Tizard, 2013).

2.4.1.4.3 Vacunas de Sub unidades

Este tipo de vacunas, comprende partes, porciones o sub unidades como su nombre lo refiere, básicamente estructuras de microorganismos, de naturaleza proteica, polisacáridos, o en combinación, del cual se entiende que es el componente estructural antigénico más importante que desencadenará una respuesta específica frente al agente infeccioso. Por ello, tiene el mismo enfoque con las vacunas de tipo muertas o inactivadas, los procesos de obtención de las subunidades estructurales activas o nativas, sin alteraciones que disminuyan su potencial antigénico, es la principal dificultad. Que, a pesar de biotecnología actual, aún sigue siendo un punto a trabajar. Así, estas vacunas si bien son seguras requieren de otros factores para que el sistema inmune sea más reactivo y producir una respuesta eficiente, lo cual, muchas veces es obtenido mediante los coadyuvantes y las repetidas dosis o refuerzos (Baxter, 2007).

2.4.1.4.4 Vacunas atenuadas

Son aquellas vacunas en el cual, a determinado microorganismo patógeno, se le ha quitado o disminuido la virulencia, disminuyendo o quitándole la capacidad de causar daño o la enfermedad, aunque sin perder la capacidad antigénica de un microorganismo infectivo, produciendo una respuesta eficiente por el sistema inmune, este proceso es denominado atenuación. Sin embargo, el proceso de atenuación requiere la adaptación de los microorganismos en cultivos artificiales o en hospederos inespecíficos que requieren del uso de recursos biológicos y puede necesitarse un tiempo relativamente extenso, como es el caso de la vacuna contra la tuberculosis que necesito de 13 años de atenuación. Además, requiere una constante evaluación que es primordial para el éxito de la vacuna, ya que un microorganismo muy atenuado no permite una adecuada respuesta y ofrece resultados similares a una vacuna muerta o inactivada; mientras que, los microorganismos no atenuados adecuadamente, pueden recuperar su virulencia y producir la enfermedad (Tizard, 2013).

2.4.1.4.5 Vacunas de última generación

La vacuna ideal, es aquella que induzca una respuesta inmune eficiente que evite la infección o enfermedad por determinado agente patógeno del cual se ha inmunizado, el cual debe ser inocuo o sin efectos secundarios, no exacerbar el sistema inmune o tener mínimos efectos post vacunales, que sea fácil de administrar, de preferencia una sola dosis y que su producción sea de bajo costo. Si bien, las vacunas antes mencionadas, como las muertas y atenuadas, han sido muy importantes frente a diversas enfermedades de gran impacto en la salud humana y animal, para otras, por su naturaleza o característica de su patogénesis, se viene utilizando nuevos tipo y sistemas que la biotecnología ofrece.

Las vacunas recombinantes o las que son producidas por ingeniería genética, son las que se vienen produciendo y evaluando a diferentes escalas, desde cultivos celulares hasta modelos animales. Así, se puede producir proteínas recombinantes, en la cual se selecciona determinado gen cuya expresión produce una proteína antigénica de un patógeno, y esta se expresa en otro microorganismo inocuo, para posteriormente purificarlo o administrarlo en

conjunto. La atenuación, ahora se puede realizar con la modificación genética, quitando genes o agregando nucleótidos que produzcan proteínas no funcionales perdiendo la capacidad de producir la enfermedad, pero se mantienen las propiedades de las proteínas antigénicas íntegras. Se puede insertar uno o más genes a un microorganismo, denominado vector, proveniente de diferentes patógenos, a través de plásmidos, enzimas recombinantes, e inducir la expresión de moléculas quiméricas para obtener vacunas vivas recombinantes, para la prevención de más de una enfermedad simultáneamente. Inclusive, se puede administrar como vacuna, nucleótidos, secuencia de genes que mediante la maquinaria del hospedero produzca un ARN mensajero y exprese la proteína antigénica de un patógeno específico, los cuales son denominados vacunas ADN. Además, debido a que la información genética de los microorganismos patógenos, está cada vez mejor registrada y disponible en el banco de genes, se pueden utilizar las secuencias para seleccionar determinadas proteínas antigénicas, candidatos vacunales, y hacer simulaciones con información genética del Complejo Mayor de Histocompatibilidad cuyas moléculas más afines, son seleccionadas, para finalmente ser expresadas y ser evaluadas en modelos *in vivo*, cuyo sistema es denominado vacunología inversa (Clem, 2011; Tizard, 2013).

2.4.1.4.6 Adyuvante

La palabra adyuvante proviene del latín “*adyuvare*”, que significa ayudar, son sustancias que van a permitir un mejor performance a las vacunas, básicamente aportan incrementando la respuesta y la velocidad del sistema inmune lo que permite una mejor interacción con el antígeno vacunal. Así, los adyuvantes van a permitir que se utilicen menores cantidades de antígeno, disminuyen el número de dosis necesarios y permiten que el sistema inmune sea estimulado para que se produzca células de memoria. Los adyuvantes realizan estas funciones a través de la protección de la molécula antigénica, protegiéndola de la rápida degradación; mediante una efectiva presentación de antígenos a las células dendríticas a través de partículas afines; y otros, con la capacidad de inducir la expresión de citoquinas y señales coestimuladoras que permitan la atracción de células inmunes efectoras, células T y B (Baxter, 2007; Tizard, 2013).

2.5 INMUNOLOGÍA DE LA VACUNACIÓN

El sistema inmune, es una compleja red, en la cual órganos linfoides, células especializadas y mensajeros químicos en conjunto con las barreras física, estructurales y fisiológicas permiten la protección frente a microorganismos patógenos, que frente a un desafío por algún agente infeccioso, ejercen una respuesta coordinada que, generalmente, conduce a la eliminación del microorganismo y protección ante una posible exposición del mismo agente, generando una memoria inmunológica (Moser and Leo, 2010). Esta respuesta y los mecanismos del sistema inmune han servido para conferir inmunidad frente a enfermedades, desde el siglo XVIII con los primeros trabajos de Edwar Jenner en 1796, utilizando costras y pústulas de lesiones en piel para inmunizar niños contra la viruela, hasta las vacunas de última generación enfocadas en la biotecnología recombinante. Los mecanismos de respuesta a las vacunas se pueden dividir para su mejor entendimiento en dos componentes, inmunidad innata y adquirida.

2.5.1 Componentes y función de la Inmunidad Innata

El primer componente estructural de defensa son las barreras físicas, que incluyen a la piel y las membranas mucosas. La inmunidad innata se compone de células especializadas que circulan en sangre y están ubicados en el sistema linfático, conformados por los fagocitos, células dendríticas y las células Asesinas Naturales o células Natural Killer; y moléculas efectoras, como son el complemento y la lisozima (Siegrist, 2013).

Las células fagocíticas están compuestas por los monocitos, macrófagos y los polimorfonucleares (neutrófilos, basófilos y eosinófilos). Los monocitos son células que circulan en la sangre que al dirigirse a un órgano específico es denominado macrófago, estas células fagocíticas tiene una función importante en la eliminación de partículas extrañas y detritus, reclutamiento de neutrófilos, procesamiento y presentación de antígenos has las células especializadas en orquestar la respuesta inmune, células T. Además, los macrófagos tienen la capacidad de producir una gran cantidad de moléculas o mensajeros químicos, que son causantes de generar efectos locales como inflamación y sistémicos, como la fiebre. Entre los polimorfos nucleares, los neutrófilos, son los considerados a ser la primera línea de defensa frente a las bacterias, ellos poseen unos gránulos, en la

cual contienen enzimas y moléculas reactivas para destruir microorganismos, son células que circulan en sangre y tienen vida corta, que a diferencia de los macrófagos, los neutrófilos mueren posterior a la fagocitosis (Tizard, 2013).

Las células dendríticas, son células especializadas en el procesamiento y la presentación de antígenos hacia linfocitos T vírgenes a través de receptores del complejo mayor de histocompatibilidad, en los que estimula su diferenciación y proliferación, siendo el puente entre inmunidad innata e inmunidad adaptativa. Mientras que, las células Asesinas Naturales, son las encargadas del reconocimiento de células infectadas y células alteradas o dañadas, como son las células cancerígenas. Que, a través de moléculas secretoras pueden lisar sus células blanco o inducir las a la muerte programada a través de receptores apoptóticos, siendo células centinelas del correcto funcionamiento celular (Moser and Leo, 2010).

El componente acelular del sistema inmune innato lo conforma el sistema del complemento, que es un conjunto de proteínas séricas, cuya función es complementar o ayudar al sistema inmune, participando en procesos importantes como la opsonización que permite la fagocitosis, la eliminación de complejos antígeno-anticuerpo y la lisis de células cubiertas por anticuerpos, con capacidad de atraer y reclutar fagocitos, siendo importante para una correcta respuesta celular, tanto para el sistema inmune innato y adquirido (Tizard, 2013).

2.5.2 Componentes y función de la inmunidad adquirida

El sistema inmune adaptativo está compuesto por células linfoides especializadas en el reconocimiento de antígenos y posteriormente ejercen una respuesta específica, a través de células colaboradoras (linfocitos T CD4+) y células efectoras (Linfocito T CD8+ y Linfocito B), esta interacción de antígenos y células inmunes adaptativas se realizan en los órganos linfoides secundarios, como son los nódulos linfáticos y el bazo, a través de la linfa que circula por el sistema linfático (Abbas et al., 2017; Tizard, 2013).

Los Linfocitos T CD4+ colaboradores (*helper*, Th), son las células que dirigen la respuesta inmune adaptativa estimulando a otras células efectoras, esta respuesta está relacionada al tipo de antígeno que es expresada por las células dendríticas, la que las activa e induce su diferenciación. Así, se han descrito al

menos 04 tipos de T colaboradores en función al perfil de citoquinas que producen y el tipo de respuesta diferenciada:

- Th1, T helper tipo I, son células que ejercen una función o respuesta frente a patógenos intracelulares, y poseen la capacidad de producir principalmente Interferón gamma, citoquina que induce la expresión de MHC y con un efecto antiviral potente, además posee la capacidad de promover la diferenciación de fagocitos y de linfocito T CD8+.
- Th2, T helper tipo II, estas células son las que ejercen una respuesta frente a los parásitos extracelulares, a través de la activación o estimulación de los eosinófilos y mastocitos por medio de las citoquinas asociadas a esta subclase, IL-4, IL-5, IL-13. Sin embargo, su sobre estimulación o incrementada respuesta produce una alta secreción de anticuerpos IgE, asociados a alergias, como el asma.
- Th17, T helper 17, es una subclase asociada a la respuesta frente a bacterias extracelulares y hongos, sus mediadores son las citoquinas IL-17 e IL-22, esta subclase posee gran importancia en la respuesta local en mucosas, tanto en el aparato digestivo y respiratorio, intestino y pulmones. No obstante, su respuesta no controlada está asociado a procesos inflamatorios crónicos y a enfermedades autoinmunes.
- Th F, T helper foliculares, esta subclase de células colaboradoras se encuentran en los órganos linfoides, específicamente en los folículos del cual proviene el nombre, y están asociados fuertemente a Linfocitos B, a los que estimula su activación y proliferación, promoviendo la producción de anticuerpos específicos de un clon antigénico de Linfocito B, teniendo gran importancia en la respuesta humoral, a través de su mediador la citoquina IL-21.

Existe un subgrupo de células T, que tienen la capacidad de controlar las respuestas exageradas y mantener la homeostasis de las respuesta inmune, estas células se denominan T reguladoras, cumpliendo una función importante en la inhibición de la Inflamación y en la Tolerancia inmunológica (Abbas et al., 2017; Siegrist, 2013; Tizard, 2013).

Los linfocitos T CD8+, son denominados citotóxicos o Linfocitos T Asesinos, ellos poseen la capacidad de reconocer antígenos a través del MHC tipo I, y tienen la capacidad de eliminar células infectadas, evitando que las células infectadas

liberen particular virales o inhibiendo la replicación de los virus al destruir la célula (Moser and Leo, 2010).

Los linfocitos B, son células que poseen un receptor BCR, que en su forma soluble es denominado anticuerpo, éstas células reconocen un antígeno específico, activándose y madurando a una célula más grande denominada, plasmocito o células plasmática, la cual producirá grandes cantidad de anticuerpos específicos frene a un patógeno, el cual cumple una función de gran importancia en la respuesta humoral frente a patógenos extracelulares (Abbas et al., 2017; Tizard, 2013).

2.5.3 Mecanismos efectores de la respuesta inmune

El sistema inmune, tanto el innato como el adquirido, han sido seleccionados para ser reactivos o realizar una respuesta de defensa frente a moléculas extrañas al que posee el hospedero, desde las biomoléculas simples hasta componentes estructurales de agentes infecciosos, para luego producir una respuesta que permita la eliminación ya sea a nivel celular y humoral, para finalmente, establecer una memoria inmunológica que permita una rápida respuesta o protección duradera frente a un agente infeccioso. Así, se ejerce una respuesta frente a cualquier componente extraño, como es el caso de una vacuna o a un patógeno. Esta respuesta, por lo tanto, se puede dividir en tres fases, el Reconocimiento de lo extraño, la respuesta para la Eliminación y la inducción de Memoria.

2.5.3.1 Reconocimiento de moléculas extrañas

Los componentes estructurales y moléculas extrañas al hospedero, que generalmente provienen de microorganismos se han definido como Patrones moleculares Asociados a Patógenos (PAMPs), cuyo reconocimiento se realiza a través de los Receptores de Reconocimiento de Patrones (PRRs). Receptores Tipo Toll (TLRs), y los receptores tipo NOD (NRLs), son los PPRs más importantes para el reconocimiento de PAMPs. Los PRRs, están ubicados en la superficie externa y a nivel intracelular, teniendo la capacidad de reconocer estructuras bacterianas en la superficie externa, y material genético, partículas y proteínas virales intracelularmente. Los TLRs de superficie, de mayor importancia son los

TLR 1, 2, 4, 5 y 6, mientras que, los ubicados intracelularmente son los TLR 3, 7, 8 y 9. Así, la inmunidad innata puede reconocer y ejercer una respuesta rápida frente a los microorganismos patógenos. Sin embargo, cuando la inmunidad innata no es capaz de contener una infección, o las moléculas extrañas permanecen, se procede a un procesamiento y presentación de antígenos por las células presentadoras de antígenos, hacia células del sistema inmune adaptativo, siendo los linfocitos T colaboradores los que reciben el antígeno procesado, y ejercen una función a través de las células efectoras, como macrófagos, Linfocitos T CD8+ y linfocitos B (Abbas et al., 2017; Moser and Leo, 2010; Tizard, 2013).

2.5.3.2 Eliminación de patógenos

Posterior al reconocimiento de patógenos a través de los PRRs, se activan una cascada de señalización que permiten la expresión genética y liberación de citoquinas y factores quimiotácticos que atraen fagocitos circulantes hacia el lugar de infección. La fagocitosis, es el principal mecanismo efector de la respuesta inmune innata, en el cual los microorganismos son engullidos e insertados dentro de vesículas intracelulares para ser destruidas por enzimas y especies reactivas de oxígeno. Este mecanismo requiere de la cantidad de fagocitos suficientes para enfrentarse a los patógenos, por ello es importante el rápido reclutamiento de células fagocíticas lo que produce una inflamación en el lugar de la infección. Las quimiocinas, producidas por macrófago y células endoteliales, son proteínas solubles que actúan como factores químicos atrayentes induciendo la migración, CCL5/RANTES, permite la atracción de fagocito al lugar de la infección. Tanto los fagocitos, como las células residentes activadas, producen citoquinas como el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), el cual incrementa la capacidad fagocítica de las células del sistema inmune innato (Abbas et al., 2017; Moser and Leo, 2010; Tizard, 2013).

La inmunidad adquirida, a través de sus células especializadas, reconoce a los antígenos a través de sus receptores, BCR o TCR, Linfocitos B y T, respectivamente, descrito previamente. La capacidad del sistema inmune para reconocer o expresar la suficiente cantidad de receptores específicos a determinado antígeno o molécula antigénica, esta explicada por el conjunto de genes que en combinación generan la gran diversidad de receptores virtualmente el sistema inmune posee mayor cantidad de receptores que antígenos existentes.

Así, linfocitos B, diferenciados a plasmocitos producen los anticuerpos, que posee la capacidad de reconocer y eliminar al patógeno de determinado antígeno reconocido, que de acuerdo a su cadena pesada, se puede clasificar en 5 isotipos o clases, IgA, IgG, IgE, IgM, esta capacidad le permite alcanzar los sitios de infección, circulando a través de la sangre y fluidos, una vez que reconoce el antígeno, lo neutraliza, bloqueando la posible interacción con su blanco celular como en el caso de los virus que bloquen las proteínas encargadas de la adhesión o interacción inicial, de la misma forma las toxinas o proteínas solubles, pueden ser neutralizadas. Además, cumplen una función de opsonización, que permite la fagocitosis y participan activando la vía del complemento que permite la destrucción y eliminación de patógenos (Moser and Leo, 2010). Esta acción es complementada con la respuesta de las células asesinas T CD8+, a través de sus proteasas, perforinas y granzimas, poseen la capacidad de destruir e inducir a la apoptosis a células infectadas, mecanismo eficiente para patógenos intracelulares. Sin embargo, esta respuesta requiere de una adecuada respuesta y regulación por parte del sistema inmune, para ello, hay una sincronización y selección de células inmunes que dirigirán la respuestas de acuerdo al tipo de patógeno, ubicación, y complejidad, teniendo gran importancia las células dendríticas y las T colaboradoras (Abbas et al., 2017; Tizard, 2013).

Las células dendríticas, cumplen un papel importante, como célula presentadora de antígenos, éstas poseen una gran cantidad de proteínas de superficie que son receptores mediadores de endocitosis y fagocitosis, los cuales están ubicados estratégicamente en tejidos periféricos, pero poseen la capacidad de migrar a órganos linfoides secundarios, en cuyo proceso de maduración expresan mayores niveles de moléculas de MHC II. No obstante, las células dendríticas tienen la capacidad de producir moléculas coestimuladoras y secretan citoquinas que van a inducir la activación y diferenciación de los distintos T colaboradores (Th1, Th2, Th17, Fh). Linfocitos T activados y diferenciados, van a regular la respuesta humoral, haciéndola más eficiente en cuanto a la producción de anticuerpos y generando una memoria inmunológica. Así, los Linfocitos B tienen la capacidad de identificar antígenos a través de sus receptores para luego activarse y diferenciarse en células plasmáticas produciendo anticuerpos sin necesidad de la interacción o colaboración de los Linfocitos T, denominándose T independiente, el cual se caracteriza por la producción de anticuerpos de baja

afinidad, IgM, que inclusive ante la exposición reiterada del antígeno pueden generar memoria. No obstante, la respuesta de anticuerpos T dependiente, en la cual interactúan tanto Linfocito T y Linfocito B, permite un cambio de clase, que induce la producción de anticuerpos de mayor afinidad, IgG, además de generar Linfocitos B de memoria, esta respuesta secundaria de anticuerpos se caracteriza por una mayor y sostenida producción de inmunoglobulinas. Sin embargo, los Linfocitos poseen afinidad solo a antígenos proteicos, (Abbas et al., 2017; Moser and Leo, 2010; Tizard, 2013).

2.5.3.3 Inducción de Memoria Inmunológica

Frente a una respuesta ante determinado microorganismo u antígeno, se produce la respuesta por células de la inmunidad innata y adquirida, una respondiendo rápidamente frente a la interacción de moléculas reconocidas como extrañas, mientras que en la segunda implica un reconocimiento de una estructura específica, denominado antígeno, en la cual se monta una respuesta por células presentadoras de antígenos que induce la diferenciación de linfocitos T vírgenes mediante las citoquinas IL-2 e IL-15, los cuales son activados y generan diversas copias celulares denominado expansión clonal y se dirigen hacia el lugar de infección o foco de la molécula extraña, en la cual participan en la eliminación de patógenos, la gran mayoría de éstas células mueren por apoptosis, mientras que, un reducido grupo sobrevive y son las células denominadas de memoria, que estimuladas por factores antiapoptóticos pueden multiplicarse inclusive aunque en menor intensidad. Las células de memoria tienen una capacidad de respuesta mucho más rápida y potente, denominada previamente como respuesta secundaria.

De manera similar a la respuesta de Linfocitos T, las respuestas mediadas por Linfocitos B o células plasmáticas, son depuradas a través de la apoptosis. Sin embargo, un reducido grupo sobrevive la cuales son denominadas Linfocitos B de memoria. Los Linfocitos B, son activados por antígenos y Linfocitos T en la paracorteza de nódulos linfáticos, una vez activadas se dirigen hacia médula ósea, bazo y otros órganos, pero algunas que serán consideradas Linfocitos B de memoria permanecen en la corteza de los nódulos linfáticos, proliferan y forman los centros germinales, los cuales poseen la capacidad de inducir un marcador CD154, en linfocitos T, los que en respuesta producen bcl-2, que tiene la capacidad de inhibir la apoptosis e induce la proliferación y diferenciación en

células de memoria. Las células de memoria en los linfocitos B, probablemente son de varios tipos, y son una reserva para una respuesta rápida y más potente frente a una segunda exposición. Así, uno de ellos, un linfocito B con un BCR de tipo IgG, frente a la exposición del antígeno específico, puede diferenciarse en una célula plasmática y multiplicarse rápidamente sin necesidad de proseguir por un proceso de mutación, y esta expansión clonal se ve incrementada en hasta 10 veces más células plasmáticas en relación a la primoexposición, de acuerdo al estímulo y permanencia del antígeno, y la intensidad de la respuesta inmune innata, se pueden producir células de memoria de larga vida, que en humanos se ha visto que posterior a una vacunación, Linfocitos B de memoria pueden ser permanecer hasta por 60 años. Mientras que en el caso de células plasmáticas de memoria, se reconocen 2 tipos, una de vida corta, la cual produce grandes cantidades de anticuerpos hasta por 2 semanas y se ubican en nódulos linfáticos y bazo; y células plasmáticas de vida larga, que pueden permanecer en promedio 10 años, ubicándose en médula ósea (Abbas et al., 2017; Tizard, 2013).

2.6 VACUNACION CONTRA ESCHERICHIA COLI EN ANIMALES

Escherichia coli es un agente infeccioso que está presente en todas las especies que han sido estudiadas, en los animales de producción se ha mencionado el impacto negativo en eficiencia productiva, afectando principalmente a los animales recién nacidos o destetados. Por ello, se inmuniza a la madre para la obtención o el reforzamiento de la inmunidad que a través de la inmunidad pasiva se protege a los recién nacidos hasta sus primeras semanas, en las que han mostrado ser más susceptibles. Así, las vacunas que se comercializan son bacterias muertas, otras acompañadas de toxinas inactivadas, de los patotipos, serotipos y tipos fimbriales más frecuentes reportados en determinada especie. A continuación, se describen las principales vacunas contra *Escherichia coli* de uso veterinario, y los estudios de nuevas alternativas de inmunización enfocados en los rumiantes.

2.6.1 Vacunas Inactivadas o bacterinas

En la industria porcina, la presencia de *Escherichia coli* esta reportada, principalmente por el patotipo Enterotocigénico (ETEC), el cual posee fimbrias F4 (k88), F5 (K99), F6 (987) y F41, los cuales están presentes en diarreas de los neonatos. Mientras que, en el destetados, F4 y F18, son los de mayor hallazgo. Sin

embargo, en menor medida, pero no menos importante, son los otros patotipos, como son los Enteropatógenos (EPEC), los productores de Shiga o Verotoxigénicos (STEC), Enteroagregativos (EAEC) y los enteroinvasivos (EIEC) (Luppi, 2017). Por ello, principalmente la inmunización se realiza a la madre contra estos patotipos, que a través del calostro confieren inmunidad a las crías. Entre las vacunas de mayor importancia tenemos: Porcilis® coli, con los tipos fimbriales F4ab, F4ac, F5, F6, ETEC con la toxina LT inactivada y otra presentación en combinación con *Clostridium perfringens* Tipo C inactivado; Suiseng®, bacterina ETEC (F4ab, F4ac, F5, F6), en combinación con la β -toxide de *Clostridium perfringens* type C; PILI SHIELD® Bacterina ETEC (K88, K99, 987P, F41); y Coliporc PLUS, bacterina que posee antígenos fimbriales y somáticos, O8; K87, K88 (F4); O149: K91, K88; O101 K99 (Matías et al., 2017).

En rumiantes, ovino y bovinos, las primeras evaluaciones mostraron que el tipo fimbrial más frecuente era el F5 (K99), en el caso del patotipo Enterotoxigénico (ETEC), el cual es el de mayor importancia en ambas especies. Por ello, las primeras vacunas utilizadas fueron bacterinas que posean células muertas ETEC – F5, cuyo mecanismo de prevención fue similar al de los cerdos, inmunizando a las madres, para proteger mediante anticuerpos calostrales a las crías susceptibles. Comercializándose desde 1991, vacunas inactivadas, y algunas asociadas a la toxina termolábil. Si bien, se viene actualizando la información de las fimbrias presentes tomando importancia F41 y F17, vacunas conteniendo F5, F6 y 41 se han producido para disminuir el riesgo de infección, considerando que ciertos tipos fimbriales son específicos de determinadas centros de producciones o localidades (Cox et al., 2014; Moon and Bunn, 1993; Nagy and Fekete, 1999).

2.6.2 Vacunas Recombinantes

El enfoque de prevenir la colonización ha sido la base para la producción de proteínas purificadas o recombinantes, o vacunas recombinantes vivas orales. Así, se ha seguido evaluando antígenos relacionados a las adhesinas fimbriales o no fimbriales. Uno de los primeros estudios, el cual purificó la adhesina fimbrial F4, el cual fue suministrado vía oral, 1 mg durante dos días consecutivos en lechones destetados, ofreció resultados alentadores, al producir anticuerpos IgM e IgA, específicos contra F4, que inclusive podía obtenerse cantidades o niveles de

anticuerpos similares a los producidos por un desafío natural o de campo, mostrando la capacidad inmunogénica de las adhesinas fimbriales como óptimos candidatos vacunales (Van den Broeck et al., 1999). Sin embargo, otra evaluación con F18, específicamente la subunidad FedF, mostro no ser tan eficiente como el evaluado con antígeno fimbrial F4, lo cual podría estar asociado a la estructura o parte de la proteína seleccionada, ciertas subunidades fimbriales no pueden ser compatibles al ser generadas sintéticamente lo cual disminuye la afinidad por sus receptores o procesamiento antigénico. No obstante, FedF, asociado covalentemente a F4, mostro la capacidad de reducir la excreción fecal de *Escherichia coli* F18 posterior a un desafío (Tiels et al., 2008; Verdonck et al., 2007).

En ovinos, se ha evaluado la capacidad de las proteínas recombinantes como antígenos vacunales. Así, se ha producido recombinantes de EspA, EspB y la parte C-terminal de intimina-gamma de 380 aminoácidos, combinados de 100 µg de cada proteína con adyuvante incompleto de Freund para ser administrado vía intramuscular, el cual tuvo 2 refuerzos a intervalos de 2 semanas, lo que produjo niveles importantes de anticuerpos específicos contra estas proteínas, además redujo la excreción de la cepa de desafío, *Escherichi coli* 0157:H7, la cual fue administrada vía oral (Yekta et al., 2011a).

Los bovinos, tanto como los ovinos, son reservorios de *Escherichia coli* 0157:H7, por ello los esfuerzos con vacunas recombinantes han sido direccionados hacia la reducción de la excreción o colonización de este patotipo de gran impacto en la Salud pública. Así, las proteínas blanco producidas fueron relacionados al sistema de secreción tipo III, EspA, EspB, tir e intimina, obteniéndose recombinantes incompletos, utilizando diversas secuencias para obtener la mejor respuesta antigénica. Obteniendo resultados diversos, uno de los más alentadores resultados fue obtenidos por Potter y colaboradores (2004), que utilizaron una mezcla de proteínas Esps y de Tir, para luego suministrarlos vía subcutánea con un adyuvante en base a una emulsión de aceite- acuoso, el cual permitió la reducción considerable de la excreción fecal de *Escherichia coli* 0157:H7 frente al desafío oral, reconociéndose como un factor importante para el éxito de estas vacunas recombinantes las dosis y los refuerzos (Cox et al., 2014; Potter et al., 2004).

2.6.3 Vacunas Vivas

Las vacunas que permiten una adecuada interacción-reconocimiento de las células del sistema inmune con el antígeno, son las que permiten una eficiente respuesta frente a la molécula extraña, determinada como antígeno. Por ello, las vacunas vivas simulan una infección o desafío natural, cuando son inoculadas por la misma vía de infección, en el cual las moléculas antigénicas son producidas en su forma nativa, además de la estimulación del sistema inmune por otros componentes estructurales de la membrana o pared celular. Así, en la búsqueda de generar una respuesta inmune más eficiente contra *Escherichia coli*, se ha evaluado de una vacuna viva F18ac, la cual fue suministrada vía oral en 3 días consecutivos en cerdos a los 10 días previos al destete, para luego ser desafiados al día 9 post destete con una cepa patógena F18 de *Escherichia coli*, los resultados mostraron una mejor producción de IgA en suero frente a los vacunados con una cepa viva de *Escherichia coli* afimbriada. Sin embargo, la protección de la colonización no fue eficiente, ni significativa en comparación a la cepa vacunal afimbriada (Bertschinger et al., 2000). No obstante, frente al desafío de *Escherichia coli* enterotoxigénica en porcinos, en lechones que fueron inmunizados vía oral, con una cepa avirulenta que poseía plásmidos para la expresión de K88 y la toxina termolábil, mostraron que la vacuna confería protección, evitando la producción de diarreas comparados con el grupo control (Francis and Willgohs, 1991). Por ello, actualmente se comercializa la vacuna viva avirulenta *Entero Vac (K88)* del laboratorio ARKO, para la prevención de diarreas en lechones, el cual recomienda la administración oral mediante el agua de consumo.

En bovinos la producción de vacunas vivas recombinantes también ha sido priorizado en la reducción de la eliminación del serotipo *Escherichia coli* 0157:H7, uno de los estudios de mayor impacto utiliza a *Salmonella enterica* Dublin avirulenta que expresa la intimina de *Escherichia coli* 0157:H7, que posterior a la colonización intestinal, evita la multiplicación y reduce la excreción fecal de 0157:H7 (Khare et al., 2010). Un enfoque nuevo de producción de vacunas es la de las bacterias fantasma, que a través de la biotecnología se utiliza fagos específicos para eliminar el contenido citoplasmático, teniendo una bacteria con todos los componentes externos, pared y membrana celular, pero sin contenido citoplasmático, bacteria vacía o fantasma, el cual fue producido un

fantasma del serotipo 0157:H7, que al ser inoculado vía subcutánea en bovinos y seguido de un desafío oral mostro una significativa reducción de la excreción fecal, a pesar de que los niveles de IgA producidos no fueron resaltantes (Vilte et al., 2012).

III. MATERIALES Y MÉTODOS

El presente estudio comprende la selección del antígeno fimbrial más frecuente de *Escherichia coli* causante de diarreas en alpacas, cuyo gen codificante fue insertado, mediante plásmidos y producido en un vector vacunal. Posterior a ello, se realizó la evaluación de la vacuna de la respuesta inmune *in vitro*, a través de la medición de citoquinas en leucocitos de alpaca. Finalmente, se evaluó la vacuna en ratones mediante la medición de anticuerpos específicos (IgA, IgG total, IgG1a, IgG2a e IgG2b), y la protección midiendo la eliminación fecal de la cepa de desafío en ratones, cuantificando las Unidades Formadoras de Colonias (UFC) mediante un PCR en tiempo real y la evaluación de la ganancia o pérdida de peso, cuyos procedimientos a continuación se detallan:

3.1 LUGAR DE ESTUDIO

El desarrollo y caracterización del antígeno vacunal fueron realizados en las instalaciones de la Facultad de Microbiología, Inmunología y Bioquímica de *The University of Tennessee Health Science Center* – Estados Unidos; mientras que, la evaluación *in vitro* de citoquinas y la evaluación de la vacunas, a través de la medición de anticuerpos y la evaluación de la eliminación de la cepa de desafío se realizó en el

laboratorio de Biología y Genética Molecular de la Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos - Perú.

3.2 DETECCIÓN DE GENES DE VIRULENCIA Y FIMBRIALES

3.2.1 Cepas de *Escherichia coli*

El aislamiento de *Escherichia coli* fue obtenida de hisopados rectales de crías de alpacas que mostraban signos clínicos asociados a diarrea de centros alpaqueros de Puno durante los años 2012 al 2015. Pruebas bioquímicas como la fermentación de azúcares, citrato, indol, movilidad, urea y descarboxilación de la lisina fueron usados para la identificación fenotípica de *Escherichia coli*. Un total de n= 226 aislados fueron evaluados para la identificación de genes de virulencia.

3.2.2 Cepas de control

Las cepas de referencia de *Escherichia coli*, usados como controles para la prueba de PCR fueron: E2348 (control negativo, sin genes de virulencia), PD1(*Sta*, *Stb* y *F18*), PD2 (*Lt*, *Stb* y *F4*), B41(*sta*, *F5*, y *F41*), EDL933 (*eae*, *stx1* y *stx2*) donados por la *Universidad Complutense de Madrid*, España. EC03 (F6+) and EC05 (F17), aislados del laboratorio de Microbiología Veterinaria de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos.

3.2.3 Detección genética

Para determinar las características de virulencia se utilizó el PCR, para la detección de genes de *E coli* asociados a los patotipos reportados en alpacas.

La extracción de ADN bacteriano se realizó siguiendo las recomendaciones del kit comercial *Genomic DNA Purification (Thermo Scientific)*. El ADN extraído se conservó a -20°C hasta su posterior utilización. La concentración del ADN fue determinada mediante comparación de intensidad de fluorescencia con el ADN de Fago Lambda digerido con la enzima de restricción Hind III (λ DNA/Hind III Markers, PROMEGA) en un gel de agarosa al 0.8% (Seakem LE Agarose, CAMBREX).

Un PCR múltiple fue realizado para la determinación de genes de virulencia asociados a los patotipos de *Escherichia coli* (*eae*, *bfp*, *Lt*, *Stx1*, *Stx2*, *sta*, *stab* y *lt*) usando los cebadores y el protocolo de Luna y colaboradores, 2012 (Cuadro 1). El volumen final fue de 20 μ l, conteniendo 2,5x Taq PCR Master Mix (Qiagen), 0.5 μ M de cada primer. Las

condiciones para la amplificación fue de 95° por 5 minutos, 35 ciclos de 95° por 30", 63° por 30" y 72° durante 60", con una extensión final de 72° durante 5'.

Posteriormente, se realizó un PCR Múltiple para la tipificación fimbrial de las cepas conteniendo genes de virulencia asociados a algún patotipo de *Escherichia coli*, usando los *primers* recomendados por Vu-Khac et al., (2007) (cuadro 01). La detección de los genes fimbriales (F4, F5, F6, F17, F18 Y F41) se realizó mediante la estandarización de un PCR múltiple. La reacción de PCR, tuvo un volumen final de 25 µl conteniendo 1X de *Taq* PCR Master Mix (Qiagen) y 0.8µM de cada *primer*. Las condiciones para la amplificación fueron: 95°C durante 5 minutos, 35 ciclos de 95°C durante 30 s, 55°C durante 30 s y 72°C durante 1 minuto, seguidos de una extensión final de 72° C durante 5 minutos. Los productos de PCR fueron analizados por medio de electroforesis en gel de agarosa (2% de agarosa en 0.5× TBE) y teñido con bromuro de etidio para su posterior visualización por irradiación UV.

Cuadro 01. Secuencias y características de los cebadores utilizados para la determinación de genes de virulencia y de fimbrias de *Escherichia coli*.

Gen	Secuencia de Primers	Productos amplificados (bp)	Referencia
<i>stx1</i>	5'-ACGTTACAGCGTGTGCRGGGATC-3' 5'-TTGCCACAGACTGCGTCAGTRAGG-3'	121	
<i>stx2</i>	5'TGTGGCTGGGTTCGTTAATACGGC-3' 5'-TCCGTTGTCATGGAAACCGTTGTC-3'	102	
<i>eaeA</i>	5'-TGAGCGGCTGGCATGAGTCATAC-3' 5'-TCGATCCCCATCGTCACCAGAGG-3'	241	Pass et al. (2000)
<i>lt</i>	5'-TGGATTCATCATGCACCACAAGG-3' 5'-CCATTTCTCTTTTGCCCTGCCATC-3'	360	
<i>sta</i>	5'-TTTCCCCTCTTTTAGTCAGTCAACTG-3' 5'-GGCAGGATTACAACAAAGTTCACAG-3'	160	
<i>stb</i>	5'-CCCCCTCTCTTTTGCACTTCTTTCC-3' 5'-TGCTCCAGCAGTACCATCTCTAACCC-3	423	
<i>bfp</i>	5'-AATGGTGCTTGCGCTTGCTGC-3' 5'-GCCGCTTTA TCCAACCTGGTA-3	194	Gunzburg et al. (1995)
<i>F4 (K88)</i>	5'-GCTGCATCTGCTGCATCTGGTATGG-3' 5'-CCACTGAGTGCTGGTAGTTACAGCC-3'	792	Vu-Khac et al. (2007)
<i>F5 (K99)</i>	5'-TGCGACTACCAATGCTTCTG-3' 5'-TATCCACCATTAGACGGAGC-3'	450	Ojeniye et al. (1994)
<i>F6 (P987)</i>	5'-TCTGCTCTTAAAGCTACTGG-3' 5'-AACTCCACCGTTTGTATCAG-3'	333	
<i>F17</i>	5'-GGGCTGACAGAGGAGGTGGGG C-3'	411	Vu-Khac et al.

	5'-CCCGGCGACAACCTTCATCACCGG-3'		(2007)
<i>F18</i>	5'-GTGAAAAGACTAGTGTTTATTTC-3'	510	Imberechts et al. (1994)
	5'-CTTGTAAGTAACCGCGTAAGC-3'		
<i>F41</i>	5'-GAGGGACTTTCATCTTTTAG-3'	431	Ojeniyi et al. (1994)
	5'-AGTCCATTCCATTTATAGGC-3'		

3.3 DESARROLLO Y EXPRESIÓN DEL ANTÍGENO VACUNAL

Los protocolos para la elaboración y producción del antígeno vacunal fueron adaptados de Gomes-Solecki et al., (2006) y se utilizó el péptido señal de OspA de *Borrelia burgdorferi*, patentado por la autora antes mencionada, y su grupo de investigación.

3.3.1 Plásmidos de expresión

La evaluación inmunogénica y la producción de anticuerpos específicos contra la proteína vacunal requería sistemas de expresión que permitan la producción de la proteína nativa y la purificación para realizar el ELISA para la medición de anticuerpos. Por ello se utilizó un vector de expresión, plásmido pET-9a, para la producción nativa, y para la purificación, el plásmido pET-28a que posee en su secuencia de genes residuos de histidina.

3.3.1.1 pET-9a

Se utilizó la secuencia optimizada, acompañada del péptido señal del gen de la fimbria F17 N° de Acceso NC_012944.1 (pVir_11 F17) del banco de genes (*Escherichia coli* Vir68), secuencia conformada por 1032 pares bases, el cual fue insertado en el plásmido pET-9a de la marca *NOVAGEN*. El plásmido posee genes de resistencia a la Kanamicina.

3.3.1.2 pET-28a

Se utilizó la secuencia optimizada, acompañada del péptido señal del gen de la fimbria F17 N° de Acceso NC_012944.1 (pVir_11 F17) del banco de genes (*Escherichia coli* Vir68), secuencia conformada por 1032 pares bases, el cual fue insertado en el plásmido pET-28a de la marca *NOVAGEN*. El plásmido posee genes de resistencia a la Kanamicina y una secuencia de residuos de histidina, para la purificación proteica.

3.3.2 Sistema de expresión

Se utilizó a la *Escherichia coli* competente BL21 de la marca *BioLabs Inc.*, para la transformación y expresión proteica del antígeno fimbrial insertado en los plásmidos pET-9a y pET-28a, para la producción de la proteína nativa y la purificación proteica, respectivamente.

La transformación se realizó de acuerdo a las instrucciones del fabricante:

- a. Descongelar un tubo con células de *E. coli* BL21 Competente en hielo por 10 minutos.
- b. Agregar 1–5 µl conteniendo 1 pg–100 ng de ADN plasmídico a la mezcla celular. Invertir cuidadosamente los tubos 4–5 veces para mezclar el ADN con las células. No utilizar Vórtex.
- c. Colocar la mezcla en hielo por 30 minutos. No mezclar.
- d. La temperatura de choque exacta es a 42° C durante 10 segundos. No mezclar.
- e. Coloque en hielo por 5 minutos. No mezclar.
- f. Transferir 950 µl de SOC (LB) a temperatura ambiente en la mezcla.
- g. Colocar a 37°C por 60 minutos. Agite vigorosamente (250 rpm).
- h. Calentar en placas de cultivo a 37°C.
- i. Mezclar las células invirtiendo los tubos y agitándolos suavemente, luego realice varias diluciones (10^{-1}) en SOC (LB).
- j. Sembrar entre 50–100 µl de cada dilución en placas de cultivo e incubar at 37°C toda la noche. Alternativamente, incubar a 30°C por 20–24 horas o a 25°C por 48 horas.

3.3.3 Producción del vector y expresión del antígeno vacunal

Se utilizó el siguiente protocolo para la inducción y expresión proteica:

- a. Se utilizó el medio de cultivo TBY (caldo Triptona y levadura), se añadió kanamicina (almacenado a -20°C) a una concentración final del medio de cultivo de 50 mg/mL.
- b. Incubar las células bacterianas de las células conteniendo pET-9a durante la noche a 37°C, en agitación a 200 rpm.
- c. Utilizar el cultivo obtenido durante la noche anterior y añadir 5 ml en cada litro de medio TBY. Añadir kanamicina.
- d. Incuba a 37°C, con agitación a 200 rpm hasta que la densidad óptica alcance 0.7 - 0.9 con el filtro de 600 nm.

- e. Una vez que el cultivo alcanza 0,7-0,9 densidad óptica, añadir 0,5 mM IPTG. (1 ml 0,5 M IPTG en cada litro).
- f. Incubar durante 3 horas a 37°C, con agitación a 200 rpm.
- g. Centrifugar el cultivo a 4000 rpm durante 8 minutos, o a 2800 rpm durante 20 minutos.
- h. Descartar el sobrenadante, añadir 5 ml de glicerol al 20% en cada sedimento que corresponde a un litro.
- i. Mezclar los sedimentos hasta su completa disolución.
- j. Almacenar en crioviales a -80°C.

3.3.4 Purificación del antígeno vacunal (F17)

Se estandarizó el presente protocolo para la purificación del antígeno vacunal:

- a. Preparar la Solución de Unión: fosfato de sodio pH 0,1M 7.5. Urea 6 M.
- b. Preparar la Solución de lavado: fosfato de sodio pH 0,1M 6.5. Urea 6 M.
- c. Preparar una Solución de elución: fosfato de sodio 0,1 M pH 4.5. Urea 6 M.
- d. Obtener una columna de purificación de proteínas, y dispensar 500 ul de resina de cobalto a la columna.
- e. Abrir la parte inferior de la columna y esperar a que la resina sedimente.
- f. Añadir 5 ml de solución de unión para acondicionar la resina.
- g. Añadir 5 ml de lisado celular en la columna, y homogenizar a 4°C 100 rpm durante 30 minutos.
- h. Añadir 5 ml de tampón de lavado y dejar fluir al abrir la columna.
- i. Medir la densidad óptica a 280 nm de la solución de lavado y mantener la columna fluyendo con la solución de lavado hasta que la densidad óptica del fluido sea el menor o similar al de la solución de lavado inicial (debe tomar de 2 a 3 lavados).
- j. Añadir 10 ml de la solución de elución y abrir la columna.
- k. Obtener el mayor eluido posible en tubos de 1ml.

3.3.5 SDS-PAGE

Se utilizó el siguiente procedimiento para la verificación de la expresión y la purificación del antígeno vacunal.

- a. Preparar un gel de resolución con un porcentaje de 12% de acrilamida
- b. Llenar el espacio entre las placas y el tanque con Tris-Glycine-SDS (TGS).

- c. Cargar 10 μ l del marcador de peso en uno de los pocillos.
- d. Cargar los pozos restantes con 20 μ l de cada muestra a evaluar.
- e. Para proteínas de 500 a 1000 aminoácidos correr por 1 hora 30 minutos y el voltaje de 100 V.

3.4 EVALUACIÓN *IN VITRO*

Para evaluar la respuesta inmune a través de la respuesta por citoquinas se utilizó un método *in vitro*, en el cual se cuantifica el ARN mensajero producido por los leucocitos de sangre periférica de alpaca frente al estímulo antigénico de la proteína vacunal, el cual consta de los siguientes pasos:

3.4.1 Obtención de leucocitos circulantes

Para obtener una alta viabilidad de las células mononucleares sanguíneas periféricas (PBMC) se utilizó sangre fresca, obtenidas de la vena yugular de la alpaca, en un tubo de ensayo de 15 ml, utilizando el anticoagulante EDTA, en solución salina PBS 1X con pH 7.4, mezclándolo con un mismo volumen de sangre obteniendo una proporción 1:1.

Se utilizó el método de centrifugación en gradiente de densidad, usándose el reactivo Ficoll®-Paque (Sigma, St Louis, MO, USA), realizándose la mezcla en una proporción de 3:4, reactivo y sangre con PBS, respectivamente. Se realizaron 2-3 lavados de las células con PBS 1X pH 7.8 y posterior centrifugación, finalmente se suspendieron en medio de cultivo RPMI 1640 con L-Glutamina (Sigma, St Louis, MO, USA).

Para la determinación de la concentración celular se uniformizó cada cultivo a una concentración de células por ml (cel/ml), se tomaron 5 μ L del paquete celular y se mezclaron con 5 μ l de dilución de azul de tripan con PBS (1:9 respectivamente), los cuales se llevaron a una cámara de Neubauer a un aumento de 400X para el conteo respectivo y la evaluación de la viabilidad celular. Las células se diluyeron en RPMI 1640 con L-glutamina, adicionando 100 IU/mL de penicilina (Sigma, St Louis, MO, USA) y 10% de Suero Fetal Bovino (SFB) (Sigma, St Louis, MO, USA inactivado

por calor. Homogenizados se colocaron en una placa de poliestireno para cultivo celular de 24 pocillos unos 1200µL de cultivo celular con una concentración final de células 1×10^6 células/mL.

3.4.2 Evaluación de la respuesta inmune

La respuesta de los leucocitos frente al estímulo del antígeno vacunal se evaluó con el siguiente esquema experimental:

Pocillo 1: Control Celular (Leucocitos circulantes).

Pocillo 2: Antígeno fimbrial – F17 (10 ng)

Pocillo 3: BL21 (10 ng) sin antígeno fimbrial (sin plásmido)

Pocillo 4: BL21+ antígeno fimbrial F17 (plásmido) (20 ng)

Se incubaron a 37° y la evaluación de la expresión de ARN mensajero de las citoquinas de la respuesta inmune celular y humoral se realizó a las 48 y 72 horas, mediante un RT-PCR y la cuantificación relativa delta delta Ct' ($\Delta\Delta Ct$). Para la evaluación de citoquinas de la respuesta inmune Th1 y Th2 de alpacas (Obdileg *et al.*, 2005) se utilizaron los siguientes cebadores:

Cuadro 02. Secuencias y características de los cebadores utilizados para las evaluaciones de citoquinas.

Genes	Secuencias	Productos pares de bases (bp)
IFN – γ	5'-ATTGTCTCCTTCTACTTCAA-3'	258
	5'-AGCGGAAGAGAAGTCAGAAT -3'	
TNF α	5'-CTACTCCCAGGTCCTCTGA-3'	251
	5'-GGTAGTTGGGCATGTTGATC-3'	
IL-2	5'-AAACTCTCCAGGATGCTCAC-3'	202
	5'-GGAAGTGAAGGGATCTGAAA-3'	
IL-4	5'-CAAAGAACACAAGTGAAG-3'	203
	5'-GGCTAAAGAAGATTATGAAG-3'	
IL-10	5'-AAGCCTTGTCGGAGATGAC-3'	246
	5'-AGCCATGAGTGAGTTCGACA-3'	
GAPDH	5'-GTGAAGGTCGGAGTGAACG-3'	356
	5'-GAGATGATGACCCTCTTGGC-3'	

5'-CTCAAGTTGGGGGACAAAAA-3'

Cuadro 03. Concentraciones y condiciones para la RT-PCR:

Reactivo	Volumen		T°	Tiempo	Ciclos
Reaction Mix	4µl	Incubación	25°C	10'	1
Maxima Enzyme			50°C	15'	1
Mix	2µl		85°C	5'	1
ARNm	1pg-5ug(2µL)				
H ₂ O	12 µl				
TOTAL	20 µl				

Luego de estandarizar se procede a realizar, se utilizó la Maxima SYBR Green qPCR, para la cuantificación con las siguientes concentraciones:

Cuadro 04. Concentraciones para la cuantificación relativa de la expresión de citoquinas mediante PCR en tiempo real.

Reactivos	[]i	[]f	Vi
ROX	10Nm-100nM		
SYBR	2X	X	12.5 µl
Pf	10 µM	0.3 µM	0.75 µl
Pr	10 µM	0.3 µM	0.75 µl
H ₂ O			9.75 µl
ADNc			2 µl
		Total	20 µl

Cuadro 05. Condiciones y ciclos para la cuantificación relativa de la expresión de citoquinas mediante PCR en tiempo real.

Condiciones y ciclos térmicos			
	Temperatura	Tiempo	Repeticiones
tUDG	50	2min	
T _D	95°C	10 min	1
T _D	95 °C	15 sec	
T _A	xx°C	60 sec	35
T _E	72°C	30 sec	
Melt curve	xx-95 °C		1

3.5 EVALUACIÓN *IN VIVO* - I

Se realizó la evaluación de la respuesta inmune de la vacuna a través de la cuantificación de los niveles de anticuerpos específicos al antígeno vacunal de tipo IgG (subclases IgG1, IgG2a e IgG2b) e IgA en ratones, posterior a la inmunización se realizó el desafío con una *E. coli* Enterohemorrágica, para finalmente cuantificar la eliminación UFC de la cepa desafío, mediante un PCR en tiempo real.

Los protocolos utilizados en la evaluación en animales de experimentación fueron aprobados por el Comité de Ética y Bienestar Animal (CEBA), de la Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos con la Autorización de Ética No 2017-003.

3.5.1 Ratones

Se obtuvieron n=24 ratones hembras, del tipo BALB/c de las instalaciones del Instituto Nacional de Salud (INS), de 5 semanas de edad, los cuales fueron agrupados en 3: Control (n=7), Control Vector (n=10) Inmunizados (n=10). Se le administró vía oral a través de una sonda intragástrica PBS al grupo control, *E.coli* (BL21) como vector y BL21 expresando la proteína F17 para la inmunización.

3.5.2 Cuantificación y viabilidad de la vacuna

- Posterior al almacenamiento a -80 °C, se utilizó un microtubo de un lote de producción, para luego diluir consecutivamente volúmenes de 1-10 µl, en microtubos con volumen final de 100 µl de PBS.

- b. Medir la densidad óptica de las diluciones a 600 nm hasta obtener como resultado 1.0 equivalente a 10^9 UFC/ml
- c. Realizar diluciones al décimo para realizar la cuantificación estándar de UFC en placas.
- d. Corroborada la cantidad de la vacuna, someter al protocolo antes mencionado para evaluar la expresión del antígeno vacunal y su visualización a través de SDS-PAGE.
- e. Diluir en PBS hasta obtener la dilución de 10^8 .

3.5.3 Grupos de evaluación

Los siguientes son los grupos de evaluación:

Grupo A: Control PBS (vía oral)

Grupo B: BL21-F17- sin plásmido 10^8 UFC (vía oral)

Grupo C: Inmunizados con BL21-F17+ 10^8 UFC (vía oral)

3.5.4 Inmunización, desafío y obtención de muestras

A los 15 días de la recepción se inmunizaron los ratones y recolectaron muestras bajo el siguiente esquema:

- a. Semana 1 (días 1, 3 y 5) inmunización de los ratones vía oral.
- b. Semana 2 (día 14), recolección de muestras de sangre y heces.
- c. Semana 3 (días 15, 17 y 19) reinmunización de los ratones vía oral.
- d. Semana 4 (día 28), recolección de muestras de sangre y heces.
- e. Semana 5 (días 29, 31 y 33) reinmunización de los ratones vía oral.
- f. Semana 6 (día 42), recolección de muestras de sangre y heces.
- g. Semana 7 (día 45), desafío.

La inmunización se realizó a través de un sonda gástrica descartable 18G, Longitud: 1 in. \times 2 mm de diámetro (*Sigma-Aldrich*), en un volumen de 100 μ l.

La obtención de sangre se realizó a través de la vena caudal, y la recolección heces frescas o posterior a la deposición a primeras horas de la mañana.

3.5.5 Elisa IgG e IgA

Los sueros de los ratones inmunizados serán sometidos a la evaluación de anticuerpos específicos IgG (subclases IgG1, IgG2a e IgG2b) e IgA contra el antígeno vacunal (F17) mediante la técnica ELISA, mediante el siguiente protocolo:

1. Agregar 100 µl de buffer (PBS) de tapiz conteniendo la proteína F17 (10 µg/ml) a cada pocillo e incubar a temperatura ambiente por 1 hora.
2. Agregar 200 µl de Buffer de bloqueo (PBS con Albumina sérica bovina (BSA) al 3%) y dejar reposar a 4°C hasta el siguiente día.
3. Lavar de 3 a 5 veces con 250ul del Buffer de Lavado (PBS conteniendo 0.05% de Tween 20).
4. Agregar 100 µl de los controles y del suero problema a una dilución de 1/100 con PBS e incubar a temperatura ambiente por 1 hora.
5. Repetir el paso 3.
6. Agregar 100 µl a cada pocillo del conjugado Anti-mouse IgG (1/2000), anti-mouse IgG1(1/300000), anti-mouse IgG2a (1/90000), anti-mouse IgG2b (1/65000) e incubar a temperatura ambiente por 30 minutos, todos los anti-anticuerpos conjugados con HRP (*Sigma-Aldrich*).
7. Repetir el paso 3.
8. Agregar 100ul de substrato HRP- (*SureBlue™ TMB Microwell*), e incubar a temperatura ambiente por 1 hora.
9. Agregar 100 µl de la solución Stop (*TMB Stop Solution KPL*)
10. Finalmente se midió la Densidad Óptica (DO) con un filtro de 450 nm, utilizando el Lector de microplacas Modelo 680 – BioTek.

3.5.6 Extracción de Proteínas totales en heces

Para la Obtención de proteínas totales, que incluyan IgA en heces se realizó el siguiente protocolo:

1. Obtener 0.2 g de heces frescas (máximo 30 min)
2. Procesar inmediatamente o almacenar a -70°C
3. Para la extracción agregar 1 ml de PBS-0.01 % de azida de sodio con 10 ul de inhibidor de proteasa (*Sigma-Aldrich*) 100X por cada 100 mg de heces.

4. Mezclar vigorosamente en el vortex de 15-20 minutos a 4 °C, hasta alcanzar la completa suspensión.
5. Centrifugar a 16000 g por 10 min a 4°C
6. Obtener el extraído y congelar a -70°C hasta su procesamiento en el ELISA.

3.5.7 Extracción de ADN fecal

Para la obtención de ADN en las muestras fecales de los ratones se utilizó el protocolo de extracción de ADN de patógenos de muestras fecales del Kit comercial *QIAamp DNA Stool Mini Kit – Qiagen*, cuyos pasos comprenden:

1. Pesar 200 mg de heces frescas y colocarlas en microcrioviales de 1.5 ml y colocarlos sobre hielo.
2. Agregue 1.4 ml del Buffer ASL a cada muestra, mezclar en el vortex por un minuto hasta que la muestra se encuentre homogénea.
3. Caliente la suspensión por 5 min a 70 °C
4. Mezcle por 15 segundos y centrifugue a máxima velocidad por 1 minuto.
5. Pipetee 1.2 ml del sobrenadante en microviales de 2 ml y descarte el pellet.
6. Agregue una tableta de *Inhibitex* a cada muestra y mezclar vigorosamente hasta obtener una completa suspensión.

3.5.8 Cuantificación de UFC mediante PCR en Tiempo Real

Se realizó un PCR en tiempo real utilizando el gen *stxI* codificante de la toxina Shiga de la cepa de desafío EHEC, para lo cual se cuantificaron cantidades (UFC) para realizar la cuantificación absoluta mediante una curva estándar de la cepa de desafío UFC/g de heces.

Se realizó la cuantificación bacteriana y curva estándar mediante el siguiente protocolo:

1. Se realizó el cultivo de la cepa de desafío EHEC en un medio líquido (caldo BHI) a 37° en movimiento de 100 rpm, durante unas 5 horas.
2. Se realizó la medición mediante un espectrofotómetro, marca *Thermo Scientific* modelo Genesis 10uv, hasta obtener una densidad óptica con el lente de 600nm: 1.25, el cual representa a 1×10^9 UFC/ml.

3. Se diluyó y obtuvo 1 ml del cultivo con una carga de 1×10^8 UFC/ml
4. Se cuantificó por el método de dilución en agar, para corroborar la medición por el espectrofotómetro.
5. Se procedió a realizar la extracción de ADN siguiendo las instrucciones del kit comercial *Genomic DNA Purification (Thermo Scientific)*. El ADN extraído se conservó a -20°C hasta su posterior utilización

Se realizó el PCR en tiempo real para la cuantificación de UFC/g en heces de los ratones desafiados, para lo cual se utilizó el gen *stx1* (toxina Shiga), se utilizó la Maxima SYBR Green qPCR, para la cuantificación con las siguientes concentraciones:

Cuadro 06. Concentraciones para la cuantificación de UFC/g en heces de los ratones BALB/c mediante PCR en tiempo real.

Reactivos	[]i	[]f	Vi
ROX	10Nm-100nM		
SYBR	2X	X	10.0 μl
Pf	10 μM	0.1 μM	0.5 μl
Pr	10 μM	0.1 μM	0.5 μl
H2O			8 μl
ADNc			1 μl
		Total	20 μl

Cuadro 07. Condiciones y ciclos para la cuantificación de UFC/g en heces de los ratones BALB/c mediante PCR en tiempo real.

Condiciones y ciclos térmicos			
	Temperatura	Tiempo	Repeticiones
T _D	95°C	10 min	1
T _D	95 °C	15 sec	
T _A	60 °C	60 sec	30
T _E	72°C	30 sec	
Melt curve	60-95 °C		1

3.6 EVALUACIÓN *IN VIVO* – II

Se repitieron los protocolos de inmunización y desafío que se realizó en la primera evaluación. Sin embargo, el objetivo en esta evaluación fue determinar la variación de la ganancia/pérdida de peso, durante una semana posterior al desafío. Para ello, se utilizaron 20 ratones BALB/c, n: 10, grupos vacunados (F17+); n: 10, grupo control (PBS). Sin embargo, uno de los ratones del grupo vacunados (F17+) fue retirado del ensayo debido a que durante la primera semana de la adaptación, se mostraba deprimido, con hipotermia y no mostraba una ganancia de peso regular, quedando el grupo finalmente con n: 09.

La medición del peso se realizó todas las mañanas (8.00 am) usando una balanza de la Marca *Digital Precision* modelo SFE-200.

El peso obtenido hasta el día 0 del desafío fue considerado para el análisis como el 100%, la ganancia o pérdida peso posterior fue equivalente al porcentaje variado.

3.7 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Las diferencias de expresión de cada citoquina fueron evaluadas usando los valores cuantitativos de expresión de citoquinas relativos mediante los intervalos de confianza mediante un gráfico de barras.

En la evaluación estadística de la producción de inmunoglobulinas (IgG e IgA), los valores cuantitativos continuos de las densidades ópticas (D.O.) fueron evaluados mediante la prueba de Normalidad de Shapiro-Wilk, posterior a ello se realizó la Prueba de Kruskal Wallis, para determinar si existían diferencias entre los grupos, finalmente se realizó la prueba de Comparación Múltiple de Dunn, para identificar las diferencias entre grupos evaluados, durante los días 0, 14, 28 y 42 días.

Para la evaluación de las diferencias en la eliminación fecal entre los grupos en evaluación, se utilizó el antilogaritmo de los resultados obtenidos de las Unidades Formadoras de Colonias (UFC) por gramo en heces. Los valores cuantitativos continuos obtenidos fueron evaluados usando la prueba de Normalidad de Shapiro-Wilk, posterior a ello se realizó la Prueba de Kruskal Wallis, para determinar si existían diferencias entre los grupos, finalmente se realizó la prueba de Comparación

Múltiple de Dunn, para identificar las diferencias entre grupos evaluados, a los 2, 4, 6 y 8 días.

Finalmente, la diferencia de ganancia de peso entre los grupos vacunados y control durante 7 días post desafío, se realizó a través de la prueba de T de Student. Todas las pruebas antes mencionadas y los gráficos se realizaron utilizando el software Graphpad Prism 7.0 (*GraphPad Software, Inc., San Diego, CA*)

IV. RESULTADOS

4.1 DETECCIÓN DE GENES DE VIRULENCIA Y FIMBRIAS

El 18.58% (42/226) de los aislados poseen al menos un gen de virulencia asociada a patotipos de *Escherichia coli*.

Cuadro 08. Resultados de la presencia de genes de virulencia de *E coli*.

<i>Escherichia coli</i>		Genes de virulencia						
Clasificación	Nº isolates	<i>eae</i>	<i>bfp</i>	<i>sta</i>	<i>stb</i>	<i>lt</i>	<i>stx1</i>	<i>stx2</i>
Enteropatógeno típico	3	3	3	-	-	-	-	-
Enteropatógeno atípico	22	22	-	-	-	-	-	-
STEC	17	13	-	-	-	-	16	1
No patógenos	184	-	-	-	-	-	-	-
Total	226	38	3	-	-	-	16	1

El 57% (24) de los aislados poseen genes al menos uno de los genes que codifican fimbrias en los genotipos patogénicos. La adhesina fimbrial F17 fue detectada en 23 aislados (54.6 %), y genes para ambos tipos fimbriales, F6 y F17, fueron detectados en un 1 aislado (2.4 %) como puede observarse en el cuadro 09.

Cuadro 09. Resultados de la detección de genes fimbriales asociados a patotipos de *Escherichia coli*.

Patotipo	Fimbria		
	F6	F17	F4, F5, F18, F41
EPEC (n=25)	-	16 (38%)	-
STEC (n=17)	1(2.4%)	7 (16.6%)	-
Total	24/42 (57%)		

4.2 PRODUCCIÓN DEL ANTÍGENO VACUNAL pET-9a

Se realizó la caracterización de la proteína recombinante F17, mediante la determinación de la naturaleza y ubicación de expresión del antígeno vacunal en el vector recombinante pET-9a, cuya predicción de peso en base a la secuencia de nucleótidos fue de 34 Kda en promedio, obteniéndose que la proteína se hallaba en la fase detergente, como se aprecia en la Figura 01.

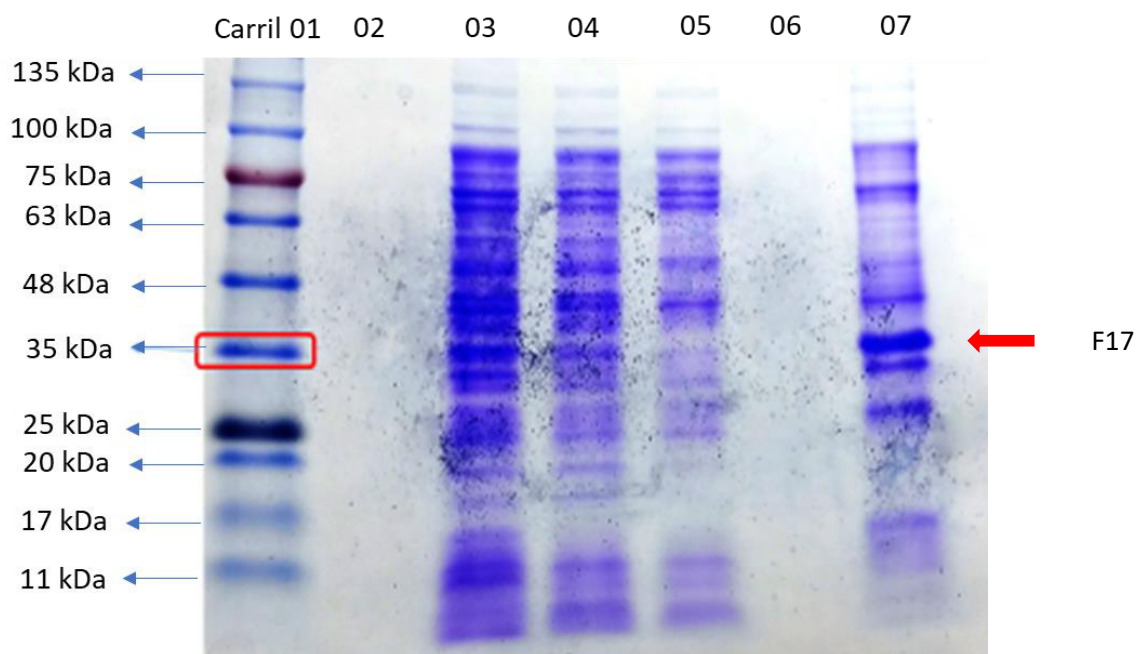


Figura 01. SDS-PAGE de la caracterización de la proteína recombinante F17 usando el plásmido pET-9a, Carril 01: Marcador de peso molecular; 02: blanco; 03: célula completa; 04: Citosol; 05: Envoltura celular; 06: Fracción acuosa y 07: Fracción detergente, flecha roja indica la proteína recombinante.

4.3 CARACTERIZACIÓN DEL ANTÍGENO VACUNAL PET-28^a

Se realizó la caracterización de la proteína recombinante F17, mediante la determinación de la naturaleza y ubicación de expresión del antígeno vacunal en el vector recombinante pET-28a, cuya predicción de peso en base a la secuencia de nucleótidos fue de 35 Kda en promedio, el cual se determinó en la fase detergente, tal como se observa en la Figura 02.

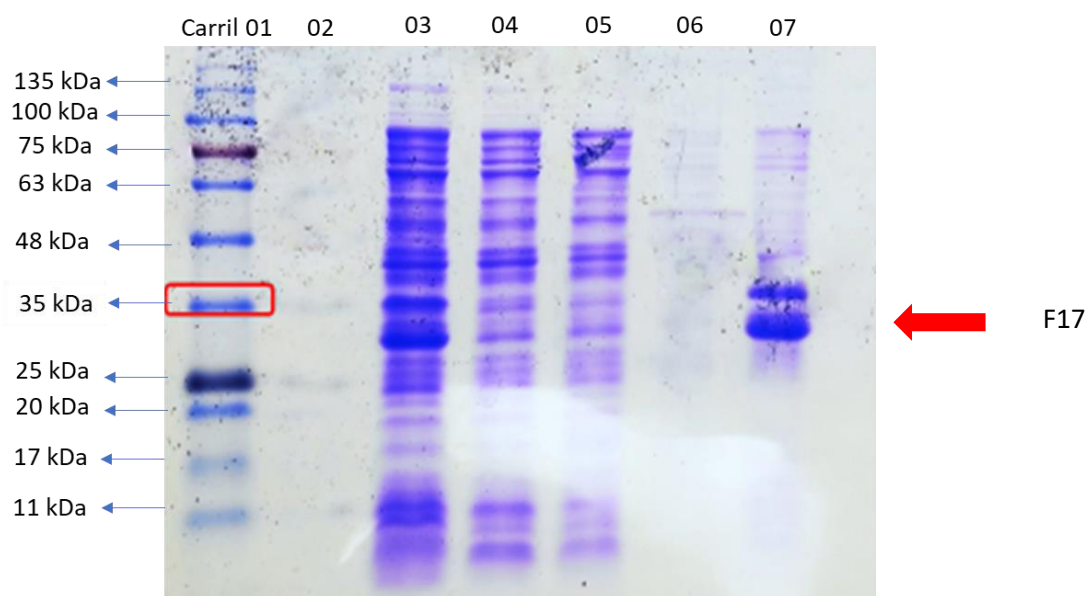


Figura 02. SDS-PAGE de la caracterización de la proteína recombinante F17 usando el plásmido pET-28a, Carril 01: Marcador de peso molecular; 02: blanco; 03: célula completa; 04: Citosol; 05: Envoltura celular; 06: Fracción acuosa y 07: Fracción detergente, flecha roja indica la proteína recombinante.

4.4 PURIFICACIÓN PROTEICA

Se realizó expresión y la purificación del antígeno vacunal en el vector de expresión *E. coli* BL21 usando el plásmido pET-28a para la purificación proteica, correspondiente a 35 Kda, a través de las colas de histidina adherida a la proteína de elección, como se observa en la Figura 03.

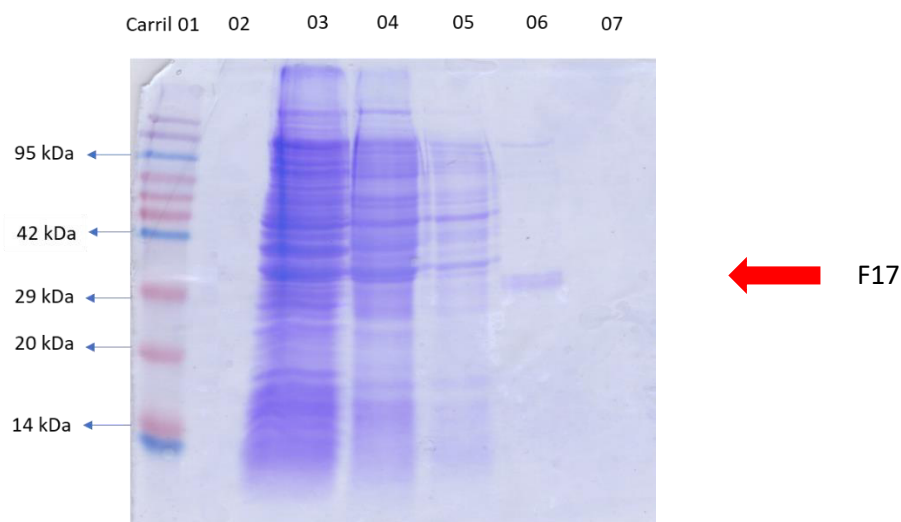


Figura 03. SDS-PAGE de la purificación de la proteína recombinante, Carril 01: Marcador de peso molecular; 02: blanco; 03: Filtrado; 04: Lavado A; 05: Lavado B; 06: Elución 01y 07: Elución 02.

4.5 WESTERN BLOT

Se realizó la evaluación de especificidad del antígeno vacunal en la purificación proteica pET-28a, correspondiente a 35 Kda, mediante la técnica de Western Blot. Obteniendo un producto único, como puede observarse en la Figura 04.

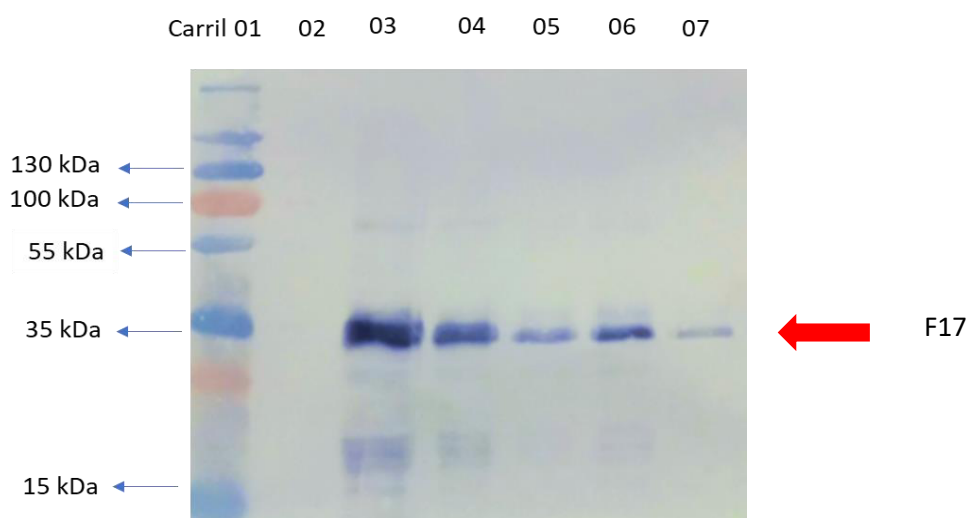


Figura 04. Western Blot usando un marcador anti histag, Carril 01: Marcador de peso molecular; 02: blanco; 03: Elución 1 04: Elución 2; 05: Elución 3; 06: Elución 4; 07: Elución 5; roja indica la proteína recombinante.

4.6 EVALUACIÓN *in vitro*

Se procedió a la evaluación de la producción de ARNm de las citoquinas Interferón gamma (IFN) , Factor de Necrosis Tumoral α , IL-2, IL-4 e IL-10, estimulada por la proteína purificada F17 en leucocitos de sangre periférica de alpaca (PBMC)

4.6.1 IFN – gamma

La expresión de Interferón gamma (IFN- γ), por leucocitos de sangre periférica de alpaca, a las 48 horas posterior a la exposición, solo se evidenció en el grupo Vector (3.87 ± 0.57), el cual mostró niveles significativamente mayores en relación al control (2.13 ± 0.58). Mientras que, a las 72 horas, tanto el Vector (5.00 ± 0.90) como la combinación Vector + F17 (4.10 ± 0.59), mostraron niveles mayores que los controles (Figura 05 y Cuadro 10).

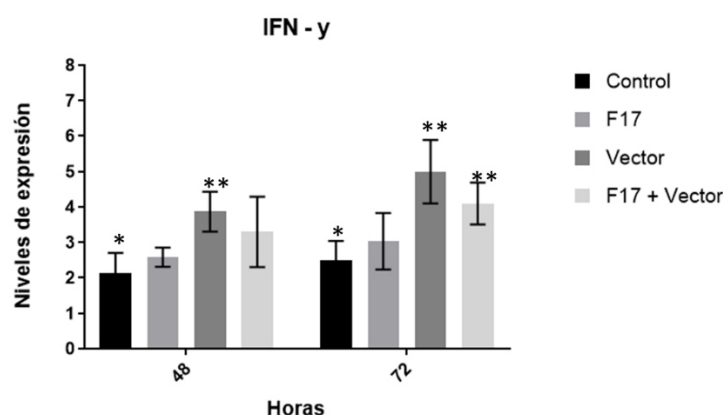


Figura 05. Niveles de expresión relativa de INF- γ producidos por células mononucleares sanguíneas periféricas estimulados por la proteína purificada F17 y componentes estructurales del vector inactivado. Barras representan la media \pm SEM.

Cuadro 10. Valores muestran la media \pm SEM de los niveles de expresión relativa de INF- γ .

Grupo	Horas	
	48	72
Control	2.13 \pm 0.58	2.51 \pm 0.53
F17	2.58 \pm 0.27	3.03 \pm 0.80
Vector	3.87 \pm 0.57	5.00 \pm 0.90
F17+Vector	3.30 \pm 0.99	4.10 \pm 0.59

4.6.2 TNF- α

La producción de TNF- α , a las 48 y 72 horas, mostraron niveles relativamente similares comparado con el control, frente a la proteína F17, vector y su combinación, no determinándose ninguna diferencia significativa, en la expresión de esta citoquina (Figura 06 y Cuadro 11).

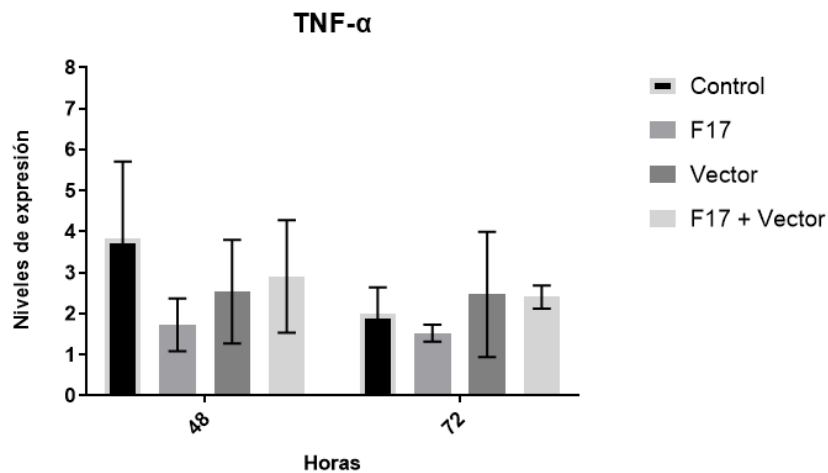


Figura 06. Niveles de expresión relativa de TNF- α producidos por células mononucleares sanguíneas periféricas estimulados por la proteína purificada F17 y componentes estructurales del vector inactivado. Barras representan la media \pm SEM.

Cuadro 11. Valores muestran la media \pm SEM de los niveles de expresión relativa de TNF- α .

Grupo	Horas			
	48		72	
Control	3.84	± 1.86	1.99	± 0.65
F17	1.73	± 0.64	1.53	± 0.20
Vector	2.54	± 1.26	2.47	± 1.52
F17+Vector	2.91	± 1.38	2.41	± 0.28

4.6.3 IL-2

La expresión de la interleucina 2 (IL-2), por leucocitos de sangre periférica de alpaca mostraron a las 48 horas posterior a la exposición de las proteínas F17, vector y su combinación, niveles significativamente mayores en relación al

control, siendo el vector (6.54 ± 1.44) el de mayor expresión por encima de F17 (3.42 ± 0.96) y la combinación Vector +F17 (3.71 ± 0.94). Sin embargo, a las 72 horas, solo el vector (5.32 ± 1.77) muestra niveles significativamente mayores, como se muestra en la Figura 07 y Cuadro 12.

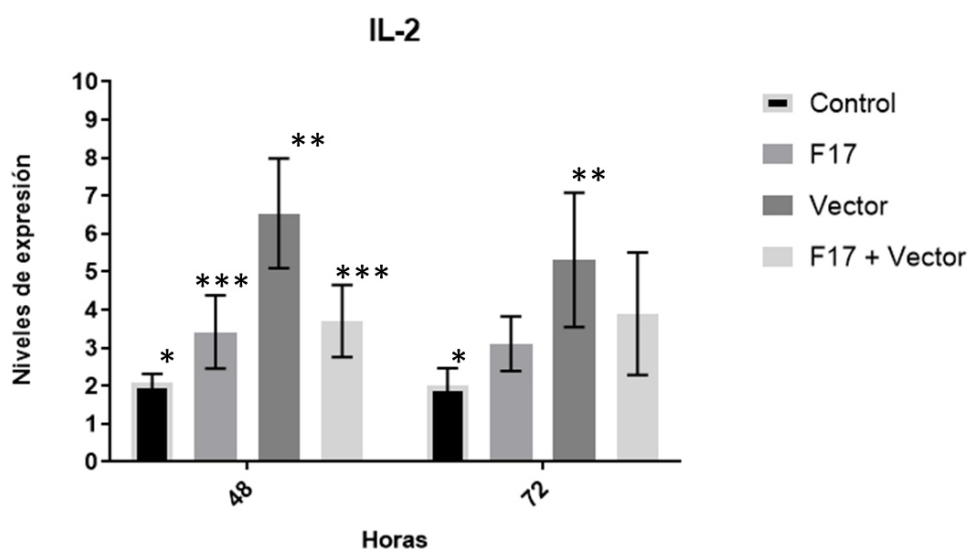


Figura 07. Niveles de expresión relativa de IL-2 producidos por células mononucleares sanguíneas periféricas estimulados por la proteína purificada F17 y componentes estructurales del vector inactivado. Barras representan la media \pm SEM.

Cuadro 12. Valores muestran la media \pm SEM de los niveles de expresión relativa de IL-2.

Grupo	Horas	
	48	72
Control	2.09 \pm 0.23	2.03 \pm 0.44
F17	3.42 \pm 0.96	3.11 \pm 0.72
Vector	6.54 \pm 1.44	5.32 \pm 1.77
F17+Vector	3.71 \pm 0.94	3.90 \pm 1.61

4.6.4 IL-4

La expresión de la interleucina 4 (IL-4) de leucocitos en sangre periférica de alpaca, a las 48 horas posterior a la exposición, solo en los grupos Vector (5.62 ± 1.12) y la combinación Vector + F17 (4.67 ± 0.42), mostraron niveles significativamente mayores en relación al control (2.82 ± 0.54). Mientras que, a las

72 horas, solo la combinación Vector + F17 (5.12 ± 0.93) expresaron niveles significativamente mayores (Figura 08 y Cuadro 13).

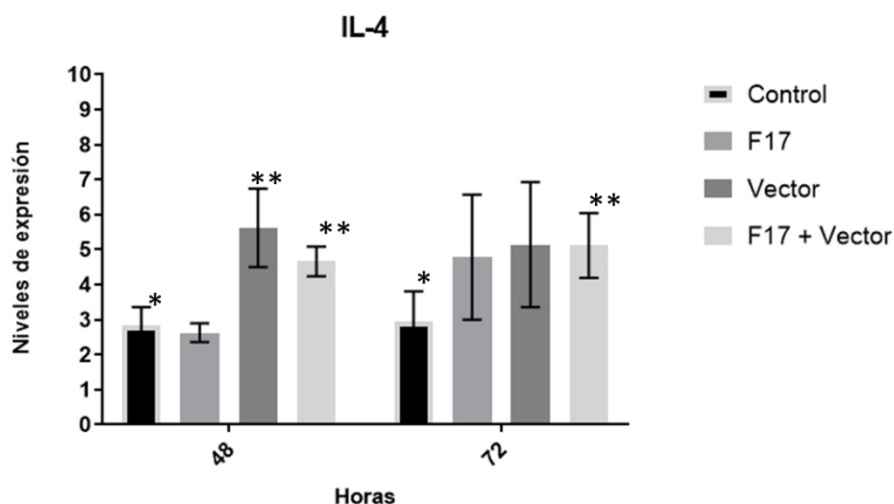


Figura 08. Niveles de expresión relativa de IL-4 producidos por células mononucleares sanguíneas periféricas estimulados por la proteína purificada F17 y componentes estructurales del vector inactivado. Barras representan la media \pm SEM.

Cuadro 13. Valores muestran la media \pm SEM de los niveles de expresión relativa de IL-4.

Grupo	Horas			
	48		72	
Control	2.82	± 0.54	2.93	± 0.88
F17	2.63	± 0.27	4.79	± 1.79
Vector	5.62	± 1.12	5.15	± 1.79
F17+Vector	4.67	± 0.42	5.12	± 0.93

4.6.5 IL-10

La expresión de la interleucina 10 (IL-10) por leucocitos en sangre periférica de alpaca, evidenció a las 48 horas posterior a la exposición que solo los grupos Vector (2.88 ± 1.23) y la combinación Vector + F17 (3.67 ± 0.97), alcancen niveles significativamente mayores en relación al control (0.98 ± 0.28). Mientras que, a las 72 horas, no hubo expresiones significativas (Figura 09 y cuadro 14).

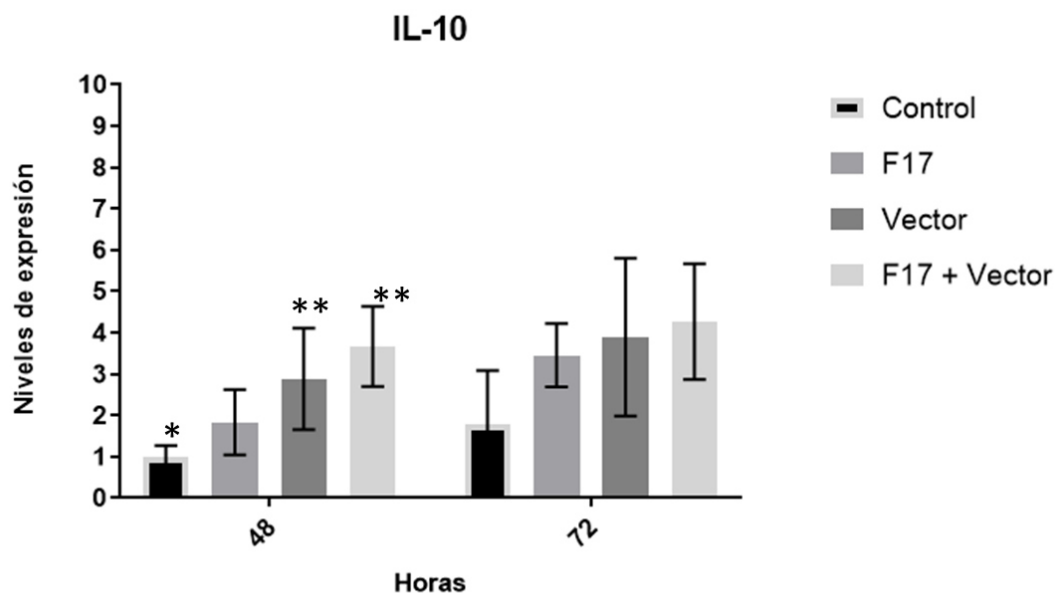


Figura 09. Niveles de expresión relativa de IL-10 producidos por células mononucleares sanguíneas periféricas estimulados por la proteína purificada F17 y componentes estructurales del vector inactivado. Barras representan la media \pm SEM.

Cuadro 14. Valores muestran la media \pm SEM de los niveles de expresión relativa de IL-10.

Grupo	Horas			
	48		72	
Control	0.98	± 0.28	1.79	± 1.30
F17	1.84	± 0.78	3.46	± 0.77
Vector	2.88	± 1.23	3.90	± 1.91
F17+Vector	3.67	± 0.97	4.27	± 1.40

4.7 Evaluación *in vivo* I

Para evaluar la inmunogenicidad de la proteína se realizó la evaluación de la producción de anticuerpos específicos contra la proteína F17 en ratones BALB/C en los días 0, 14, 28 y 42. Control: Control PBS (vía oral), Vector: BL21-F17- sin plásmido 10^8 UFC (vía oral) y Anti-F17: Inmunizados con BL21-F17+ 10^8 UFC (vía oral)

4.7.1 IgG

La producción de inmunoglobulinas G total en ratones BALB/c posterior a la inmunización, produjo densidades ópticas (DO) relacionado con la producción de anticuerpos, significativamente mayores en el grupo de los inmunizados con la F17 en comparación a los grupos: Vector y Control. Obteniendo F17, a los días 14 (DO: 1.048), día 28 (DO:1.19) y al día 42 (DO:1.155) (Cuadro 15).

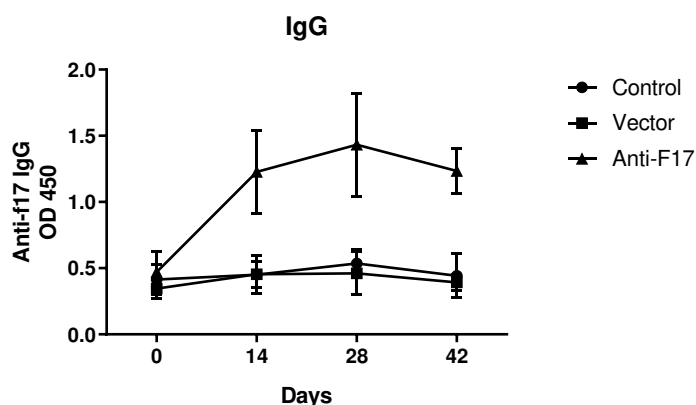


Figura 10. Cinética de expresión de anticuerpos IgG total en ratones BALB/c posterior a la inmunización. Valores expresan la media \pm SEM.

Cuadro 15. Medianas de las densidades ópticas a 450 nm de IgG total correspondiente a cada grupo experimental durante los primeros 42 días. Superíndices diferentes dentro de las columnas representan diferencias estadísticas mediante la Prueba de Kruskal-Wallis con Comparación múltiple de Dunn ($p < 0.05$).

Grupo	Días post inmunización			
	0	14	28	42
Control	0.432 ^a	0.446 ^a	0.522 ^a	0.467 ^a
Vector	0.336 ^a	0.534 ^a	0.405 ^a	0.397 ^a
Anti-F17	0.404 ^a	1.048 ^b	1.190 ^b	1.155 ^b

4.7.2 IgG1

La producción de IgG1 en ratones BALB/c posterior a la inmunización, produjo densidades ópticas (DO) relacionado con la producción de anticuerpos, significativamente mayores en el grupo de los inmunizados con la F17 en comparación a los grupos: Vector y Control. Obteniendo F17 al día 28 (DO: 0.337) y al día 42 (DO: 0.407) (Cuadro 16).

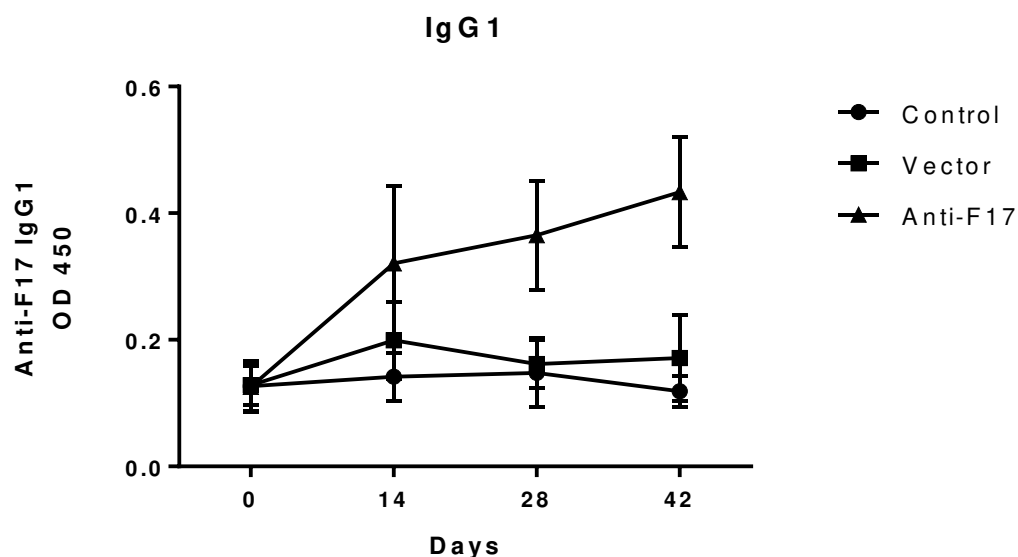


Figura 11. Cinética de expresión de anticuerpos IgG1 en ratones BALB/c posterior a la inmunización. Valores expresan la media \pm SEM.

Cuadro 16. Medianas de las densidades ópticas a 450 nm de IgG1 correspondiente a cada grupo experimental durante los primeros 42 días. Superíndices diferentes dentro de las columnas representan diferencias estadísticas mediante la Prueba de Kruskal-Wallis con Comparación múltiple de Dunn ($p < 0.05$).

Grupo	Días post inmunización			
	0	14	28	42
Control	0.112 ^a	0.127 ^a	0.140 ^a	0.113 ^a
Vector	0.127 ^a	0.202 ^{a,c}	0.185 ^a	0.153 ^a
Anti-F17	0.108 ^a	0.250 ^{b,c}	0.337 ^b	0.407 ^b

4.7.3 IgG2a

La producción de Ig2a en ratones BALB/c posterior a la inmunización, produjo densidades ópticas (DO) relacionado con la producción de anticuerpos, significativamente mayores en el grupo de los inmunizados con la F17 en comparación a los grupos: Vector y Control. Obteniendo F17 al día 14(DO: 0.530, 28 (DO: 0.755) y al día 42 (DO: 0.653) (Cuadro 17).

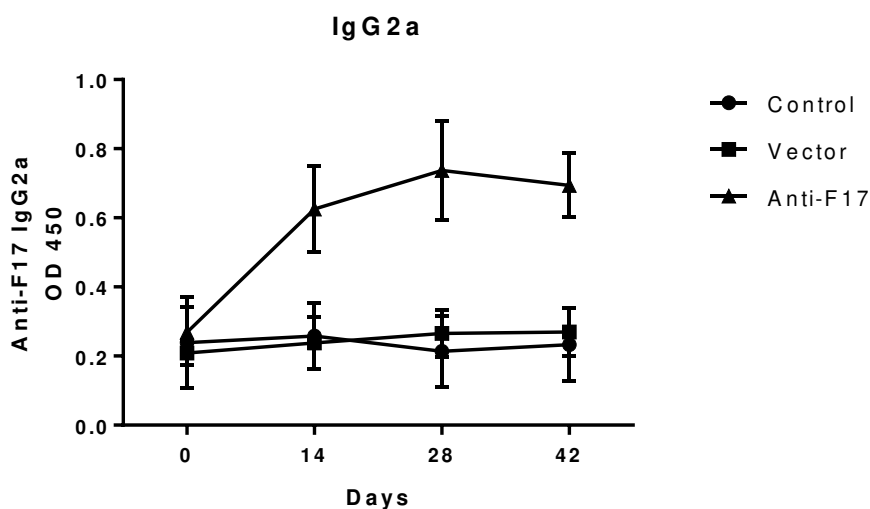


Figura 12. Cinética de expresión de anticuerpos IgG2a en ratones BALB/c posterior a la inmunización. Valores expresan la media \pm SEM.

Cuadro 17. Medianas de las densidades ópticas a 450 nm de IgG2a correspondiente a cada grupo experimental durante los primeros 42 días. Superíndices diferentes dentro de las columnas representan diferencias estadísticas mediante la Prueba de Kruskal-Wallis con Comparación múltiple de Dunn ($p < 0.05$).

Grupo	Días post inmunización			
	0	14	28	42
Control	0.195 ^a	0.197 ^a	0.205 ^a	0.188 ^a
Vector	0.196 ^a	0.246 ^a	0.232 ^a	0.233 ^a
Anti-F17	0.261 ^a	0.530 ^b	0.755 ^b	0.653 ^b

4.7.4 IgG2b

La producción de Ig2b en ratones BALB/c posterior a la inmunización, produjo densidades ópticas (DO) relacionado con la producción de anticuerpos, significativamente mayores en el grupo de los inmunizados con la F17 en comparación a los grupos: Vector y Control. Obteniendo F17 al día 14(DO: 0.763), 28 (DO: 0.716) y al día 42 (DO: 0.751) (Cuadro 18).

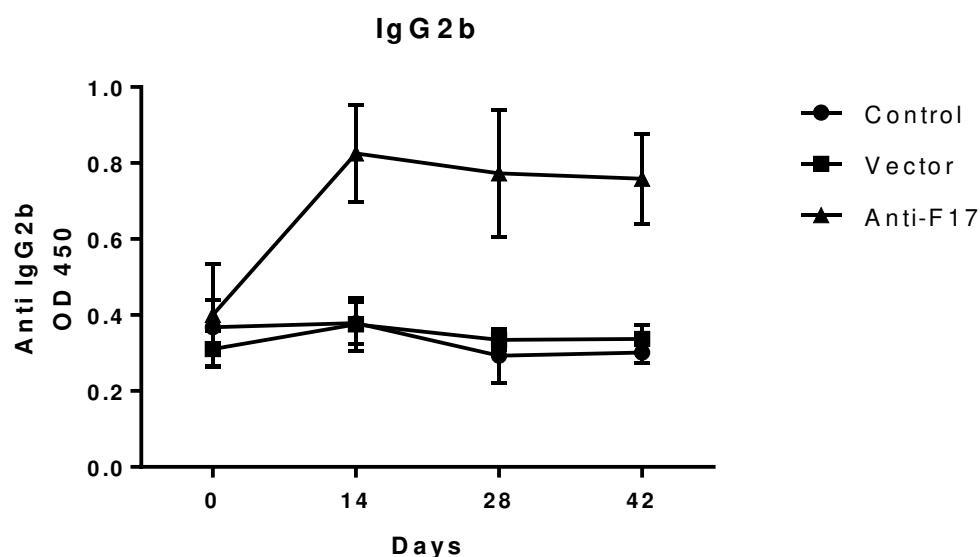


Figura 13. Cinética de expresión de anticuerpos IgG2b en ratones BALB/c posterior a la inmunización. Valores expresan la media \pm SEM.

Cuadro 18. Medianas de las densidades ópticas a 450 nm de IgG2b correspondiente a cada grupo experimental durante los primeros 42 días. Superíndices diferentes dentro de las columnas representan diferencias estadísticas mediante la Prueba de Kruskal-Wallis con Comparación múltiple de Dunn ($p < 0.05$).

Grupo	Días post inmunización			
	0	14	28	42
Control	0.366 ^a	0.381 ^a	0.263 ^a	0.306 ^a
Vector	0.316 ^a	0.362 ^a	0.329 ^a	0.333 ^a
Anti-F17	0.304 ^a	0.763 ^b	0.716 ^b	0.751 ^b

4.7.5 IgA

La producción de IgA en ratones BALB/c posterior a la inmunización, produjo densidades ópticas (DO) relacionado con la producción de anticuerpos, significativamente mayores en el grupo de los inmunizados con la F17 en comparación a los grupos: Vector y Control. Obteniendo F17 al día 14(DO: 0.962), 28 (DO: 0.909) y al día 42 (DO: 1.206) (Cuadro 19).

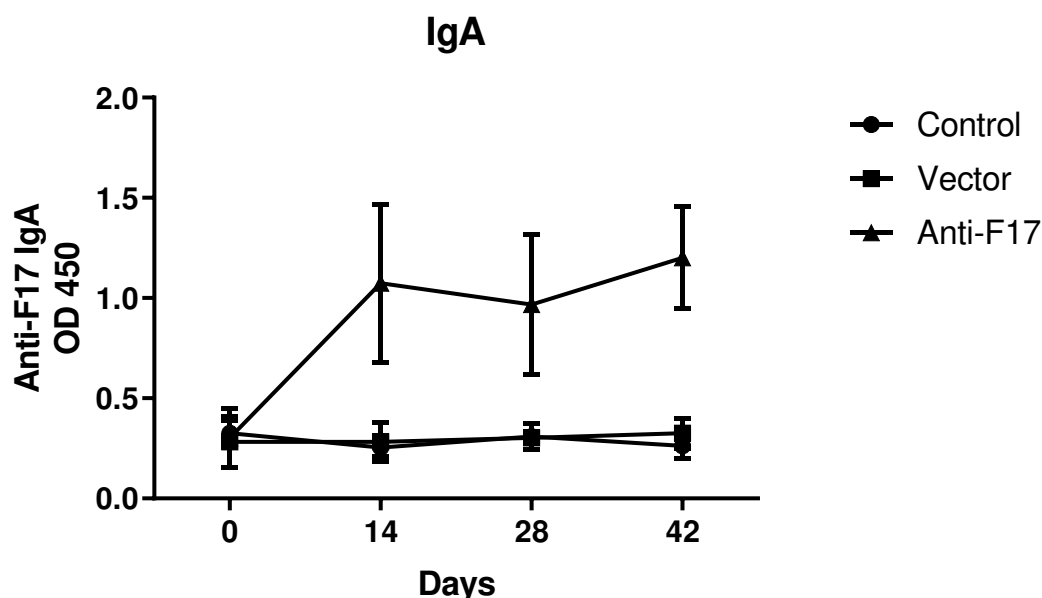


Figura 14. Cinética de expresión de anticuerpos IgA en ratones BALB/c posterior a la inmunización. Valores expresan la media \pm SEM.

Cuadro 19. Medianas de las densidades ópticas a 450 nm de IgA correspondiente a cada grupo experimental durante los primeros 42 días. Superíndices diferentes dentro de las columnas representan diferencias estadísticas mediante la Prueba de Kruskal-Wallis con Comparación múltiple de Dunn ($p < 0.05$).

Grupo	Días post inmunización			
	0	14	28	42
Control	0.330 ^a	0.260 ^a	0.320 ^a	0.260 ^a
Vector	0.270 ^a	0.290 ^{a,c}	0.300 ^a	0.320 ^{a,c}
Anti-F17	0.250 ^a	0.962 ^{b,c}	0.909 ^a	1.206 ^{b,c}

4.7.6 Evaluación de la carga bacteriana (UFC/g)

Se realizó la evaluación protectora de la proteína recombinante F-17 a los ratones BALB/C previamente inmunizados para lo cual se utilizó una cepa de desafío EHEC, luego se midió la colonización a través de la carga de eliminación de bacterias de la cepa desafío en unidades formadoras de colonias (UFC/g) mediante un PCR en tiempo real utilizando como gen codificante de la toxina Shiga, cuyos resultados muestran al día 02 que los tres grupos eliminaban la carga promedio de 10^5 UFC/g. Sin embargo, a los días 4 y 6, el grupo de Inmunizados con F17, disminuyó significativamente su carga $10^{5.1}$ y $10^{3.7}$, respectivamente, mientras que los grupos

Control y Vector, mostraron cargas bacterianas altas, 10^7 y $10^{5.5}$, mientras que al día 08, todo los grupos redujeron su carga hasta 10^3 (Ver Figura 15 y cuadro 20)

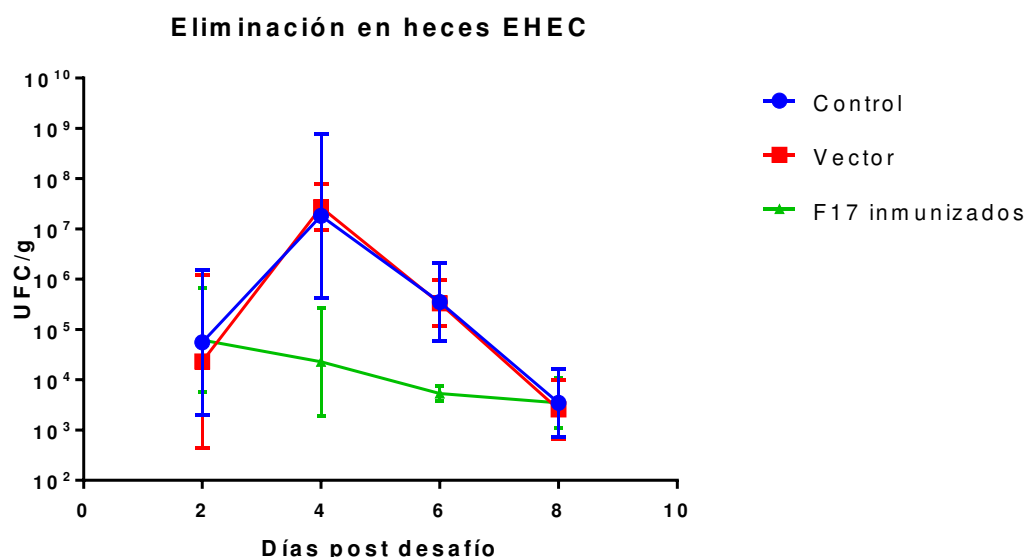


Figura 15. Eliminación en heces de la cepa de (EHEC) posterior al desafío, expresado en UFC/g en ratones BALB/c previamente inmunizados. Valores expresan la media \pm SEM.

Cuadro 20. Medianas de los logaritmos en base 10 de las UFC/g en heces. Superíndices diferentes dentro de las columnas representan diferencias estadísticas mediante la Prueba de Kruskal-Wallis con Comparación múltiple de Dunn ($p < 0.05$).

Grupo	Días post inmunización			
	0	14	28	42
Control	5.100 ^a	7.808 ^a	5.662 ^a	3.725 ^a
Vector	5.031 ^a	7.577 ^a	5.757 ^a	3.612 ^a
Anti-F17	5.154 ^a	5.156 ^b	3.733 ^b	3.768 ^a

4.8. EVALUACIÓN *in vivo* II

4.8.1. Variación de peso

Se evaluaron la ganancia y/o pérdida de peso de los ratones BALB/c posterior al desafío con una cepa EHEC, en los grupos inmunizados y control. Para ello, se midieron los pesos durante los 7 días posteriores al desafío, el peso del ratón al día 0 (cuadro 21 y 22) representó el 100%. Los resultados obtenidos muestran diferencias significativas durante los primeros 04 días, mostrando una diferencia en el tercer día

de hasta un 10%, Inmunizados: 112.24 +1.33 y Control: 101.78 +2.57 b (Figura 16 y Cuadro 23).

Cuadro 21. Pesos obtenidos del grupo de ratones Inmunizados posterior al desafío (día 0), representados en la parte superior en gramos y la parte inferior en porcentajes.

Días PI	Inmunizados (g)									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
0	30.12	25.08	-	30.09	26.05	31.50	32.50	25.50	29.10	28.00
1	31.9	26.47	-	31.14	27.4	32.24	33.56	27.86	29.24	28.18
2	33	27.47	-	33.05	28.47	33.25	33.85	29.05	29.76	28.83
3	33.7	28.85	-	33.88	29.4	33.73	34.55	29.7	31.2	30.1
4	34.38	28.49	-	34.76	29.81	34.45	34.55	30.04	31.52	30.47
5	33.51	27.31	-	33.82	29.6	34.39	34.16	29.59	30.05	30.42
6	34.13	26.98	-	32.91	29.72	34.21	33.62	29.71	29.62	29.78
7	31.32	24.47	-	32.25	29.92	33.93	33.17	28.51	28.53	28.48
(%)										
0	100.00	100.00	-	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00
1	105.91	105.54	-	103.49	105.18	102.35	103.26	109.25	100.48	100.64
2	109.56	109.53	-	109.84	109.29	105.56	104.15	113.92	102.27	102.96
3	111.89	115.03	-	112.60	112.86	107.08	106.31	116.47	107.22	107.50
4	114.14	113.60	-	115.52	114.43	109.37	106.31	117.80	108.32	108.82
5	111.25	108.89	-	112.40	113.63	109.17	105.11	116.04	103.26	108.64
6	113.31	107.58	-	109.37	114.09	108.60	103.45	116.51	101.79	106.36
7	103.98	97.57	-	107.18	114.86	107.71	102.06	111.80	98.04	101.71

Cuadro 22. Pesos obtenidos de los ratones del grupo Control posterior al desafío (día 0), representados en la parte superior en gramos y la parte inferior en porcentajes.

Días PI	Control (g)									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
0	28.00	32.00	33.00	31.00	29.50	32.00	35.00	32.50	31.50	34.50
1	27.84	31.32	32.26	30.45	31.68	32.69	33.45	32.86	31.18	35.3
2	27.29	30.85	31.23	29.85	32.12	34.04	29.2	32.52	30.44	34.12
3	26.68	30.67	32.02	29.45	33.34	35.48	30.76	33.86	32.16	35.64
4	27.13	31.13	32.42	30.04	33.13	36.54	30.46	34.11	33.34	35.96
5	27.65	31.16	32.37	29.65	31.29	35.41	27.31	33.96	31.62	34.93
6	30.73	32.29	35.41	32.02	29.82	35.48	25.91	33.6	30.59	34.34
7	31.59	31.79	34.31	32.24	28.75	34.66	24.33	32.2	28.11	34.11
(%)										
0	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00
1	99.43	97.88	97.76	98.23	107.39	102.16	95.57	101.11	98.98	102.32
2	97.46	96.41	94.64	96.29	108.88	106.38	83.43	100.06	96.63	98.90
3	95.29	95.84	97.03	95.00	113.02	110.88	87.89	104.18	102.10	103.30
4	96.89	97.28	98.24	96.90	112.31	114.19	87.03	104.95	105.84	104.23
5	98.75	97.38	98.09	95.65	106.07	110.66	78.03	104.49	100.38	101.25

6	109.75	100.91	107.30	103.29	101.08	110.88	74.03	103.38	97.11	99.54
7	112.82	99.34	103.97	104.00	97.46	108.31	69.51	99.08	89.24	98.87

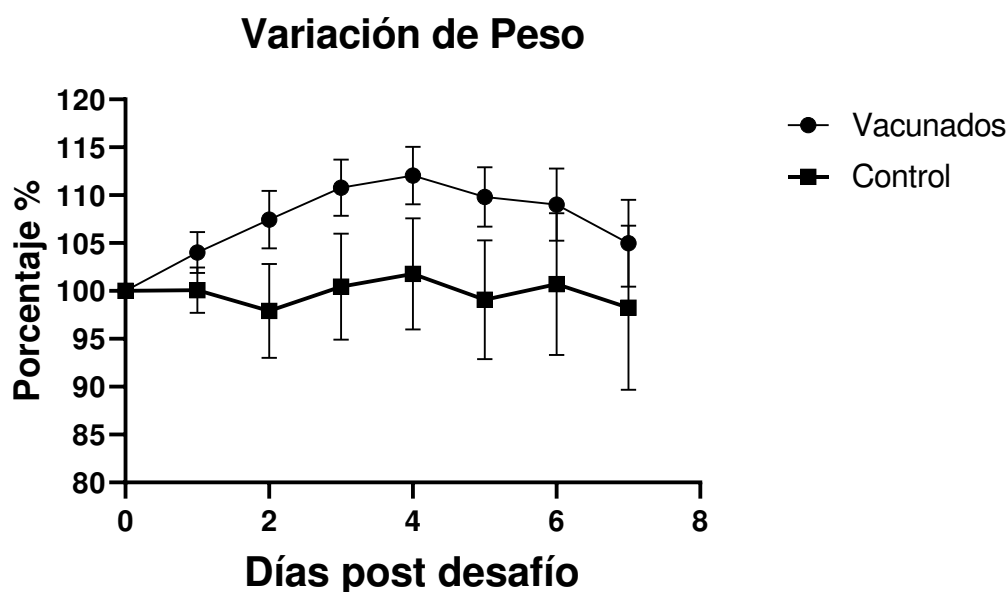


Figura 16. Gráfico con la variación del porcentaje de peso durante la primera semana posterior al desafío en ratones BALB/c inmunizados. Símbolos representan la media \pm SEM.

Cuadro 23. Valores en porcentajes muestran la media \pm SEM del porcentaje de ganancia/pérdida de peso, Superíndices diferentes dentro de las columnas (días) representan diferencias estadísticas mediante la Prueba de T de Student no pareado ($p < 0.05$).

Grupo	Días post desafío						
	1	2	3	4	5	6	7
Inmunizados	104.01 \pm 0.93 ^a	107.45 \pm 1.30 ^a	110.77 \pm 1.27 ^a	112.03 \pm 1.30 ^a	109.82 \pm 1.34 ^a	109.01 \pm 1.64 ^a	104.99 \pm 1.97 ^a
Control	100.08 \pm 1.05 ^a	97.91 \pm 2.17 ^b	100.45 \pm 2.45 ^b	101.79 \pm 2.57 ^b	99.08 \pm 2.74 ^b	100.73 \pm 3.28 ^a	98.26 \pm 3.78 ^a

V. DISCUSIÓN

El objetivo del presente trabajo de investigación fue el desarrollo y evaluación de un candidato vacunal contra *Escherichia coli* patogénico de alpacas. El desarrollo del candidato vacunal implicó la selección de un antígeno fimbrial, cuya secuencia fue insertada en plásmidos y vectores, para la obtención de la proteína recombinante. Posterior a ello, ser evaluado en cultivos celulares midiendo la expresión de citoquinas y se utilizó ratones BALB/c para la evaluación de producción de anticuerpos, para desafiarlos con una cepa patógena representativa, para luego medir la protección con indicadores como la colonización a través de la eliminación en heces y la variación del peso.

El primer paso fue complementar la información de las cepas patógenas de mayor frecuencia en procesos entéricos causados por *E. coli* en alpacas antes reportadas, mediante la detección de genes de virulencia específicos para cada patotipo, usando el PCR convencional, se obtuvo 42/226 (18.58%) de cepas que al menos poseen un gen de virulencia, porcentajes similares a los reportados en un estudio de 303 cepas de *E. coli* obtenidos de alpacas con cuadros diarreicos el cual obtuvo un 12.88% de cepas patógenas (Mori et al., 2014). Sin

embargo, porcentajes muy por debajo en relación a otro estudio, en el cual se obtuvo 58% de cepas potencialmente patógenas (Luna et al., 2012) cuya diferencia se podría explicar a que cada localidad de producción muestra diferentes frecuencias de carga y cepas patógenas circulantes de *E. coli* debido a sus diferencias en su manejo sanitario y alimentación. No obstante, cepas de *E. coli* con los mismos genes de virulencia se han ido reportando sistemáticamente, desde casos únicos hasta brotes menores, de diferentes grado de lesiones como son enteropatías hasta infecciones sistémicas, en diferentes estudios de distintas localidades del mundo que se dedican a la producción de camélidos sudamericanos (Bravo de Rueda, 2006; Foster et al., 2008; Cid et al., 2012). Los patotipos detectados en el presente estudio, muestran 25/42 (59.5%), cepas pertenecientes al patotipo enteropatógeno (EPEC), mientras que 17/42 (40.5%) con genes asociados a la producción de Shiga toxina (STEC), resultados con proporción distintas a otro estudio, en la cual predominan los patotipos productores de Shiga toxina, obteniendo 23/39 (58%) cepas de STEC y 16/39(42%) a EPEC (Mori et al., 2014), cuya diferencia podría ser explicada por la interacción con otros animales, debido a que en la producción de ciertas poblaciones de alpacas, éstas conviven con bovinos y/o ovinos, siendo los bovinos reservorios de cepas de *E. coli*. productoras de toxina Shiga. De manera similar, otra evaluación reportó cepas correspondientes a EPEC (80%) y productores de Shiga toxina EHEC (20%) (Luna et al., 2012), y la evaluación en 6 centros de producción de alpacas de Puno, obteniendo mayores frecuencias el patotipo EPEC, y en menor proporción las cepas de *E. coli* productoras de Verotoxinas o Shiga toxinas(1 y 2) (Cid et al., 2012), este predominio de las EPEC en el presente estudio podría explicarse debido a que se utilizaron similares metodologías de muestreo al utilizado por Luna y colaboradores, tomándose muestras de alpacas con cuadros diarreicos, incrementándose la presencia de cepas productoras de diarreas en animales jóvenes. Sin embargo, no se ha determinado la presencia de genes asociados al patotipo Enterotoxigénico (ETEC) en alpacas, al igual que estudios previos (Whitehead and Anderson, 2006).

Respecto al tipo fimbrial predominante entre las cepas patógenas aisladas de alpacas, se evaluó mediante PCR convencional la presencia de adhesinas fimbriales más comunes en *Escherichia coli* asociados a diarreas y cuadros sistémicos, buscando los genes F4, F5, F6, F17, F18 y F41), obteniéndose 57% cepas con fimbrias. Si bien, otros estudios para determinar los tipos de fimbrias presentes en *Escherichia coli*, han ofrecido resultados variables en cuanto al tipo fimbrial predominante, dependiendo de la especie evaluada, teniendo frecuencias desde 30 al 70% de cepas con genes a uno más fimbrias (Blanco et al.,

1991; Wolf, 1997; Wray et al., 1993), la frecuencia alta de cepas fimbriadas, hallado en el presente estudio podría deberse a que las muestras analizadas fueron aislados patógenos, los cuales, además de fimbrias poseen otros factores de virulencia. El tipo fimbrial de mayor frecuencia en el presente estudio fue el F17 (23/42; 54.6%), el cual ha estado presente en casi todas las especies evaluadas, reportándose en diferentes estudios en porcinos en un mínimo porcentaje (Ojeniyi et al., 1994; Vu-Khac et al., 2007); mientras que, en bovinos y ovinos, las frecuencias son altas o predominantes, inclusive se han determinado hasta 4 variantes de F17, implicadas en diarreas y septicemias de bovinos (Bihannic et al., 2014; Bougu et al., 1999; Mainil et al., 2000; Nguyen et al., 2011). Además se reportan *Escherichia coli*, no enterotoxigénico con porcentajes altos de fimbria F17 de corderos y cabras (Greve et al., 1999). En alpacas, una evaluación con antisueros ofreció resultados positivos a los tipos fimbriales F41 y F6 en una misma cepa (Morales and Paredes, 2007), determinándose en el presente estudio una cepa positiva a dos tipos fimbriales, F6 y F17. La tipificación genética de las fimbrias permite evaluación epidemiológica de las cepas patógenas circulantes, para la obtención de un posible candidato vacunal específico para la especie estudiada, en la cual la fimbria F17 resultó la seleccionada.

Para el desarrollo de la proteína recombinante, se utilizó la secuencia optimizada, acompañada del péptido señal del gen de la fimbria F17 N° de Acceso NC_012944.1 (pVir_11 F17) del banco de genes (*Escherichia coli* Vir68), secuencia conformada por 1032 pb, el cual fue insertado en el plásmido pET-9a, conteniendo genes de resistencia a la Kanamicina. La misma secuencia fue insertada en el plásmido pET-28a, incluyendo genes de resistencia a la Kanamicina y una secuencia de residuos de histidina, para la purificación proteica, ambos de la marca *NOVAGEN*. Que, posterior a la caracterización proteica, ambos plásmidos expresaron la proteína recombinante F17 utilizando el vector BL21, el cual es uno de los más usados para la síntesis de proteínas recombinantes (Rosano and Ceccarelli, 2014). La producción de la fimbria F17, se obtuvo utilizando los plásmidos pET-9a y pET-28a, en los cuales se obtuvieron productos, como los estimados previamente, de 34 Kda en promedio (Figura 01 y 02). Utilizando las colas de histidina, se pudo purificar la proteína (Figura 03), y para corroborar la purificación se realizó un western blot, del cual se obtuvo bandas únicas de 34 Kda en promedio, en todas las eluciones (Figura 04), resultado de procedimientos estandarizados que han sido utilizados para la expresión y purificación de otras proteínas fimbriales de *Escherichia coli*, como son las fimbrias de ETEC, CFA/I y CS4 (Curtis et al., 2016) , F9 de EHEC del serotipo O157:H7 (Mohawk et al., 2010), inclusive hasta la

expresión de varias adhesinas fusionadas, dímeros y trímeros, en *Escherichia coli* uropatogénica (UPEC) (Luna-Pineda et al., 2016). Inclusive, se ha realizado la producción de proteínas recombinantes como vacunas enfocados en factores de virulencia y fimbrias fusionadas en cerdos (Zhang et al., 2018).

Posterior a la purificación proteica, se prosiguió con la evaluación del efecto de la proteína recombinante F17, el Vector y en combinación Vector + F17, sobre leucocitos de sangre periférica de alpaca, midiendo la expresión de citoquinas (INF- γ , TNF- α , IL-2, IL-4 e IL-10). Para ello, la medición de la expresión de ARN mensajeros de la citoquina con PCR en tiempo real se obtuvo mediante la cuantificación relativa utilizando el método Ct comparativo o $2^{-(\Delta\Delta Ct)}$, en el cual se utiliza un gen normalizador, que para este estudio fue GAPDH, gen conservado que permite óptimos análisis de cuantificación relativa de genes (Livak and Schmittgen, 2001). La evaluación de citoquinas y su producción frente a estímulos, es una de las herramientas para la evaluación del sistema inmune, siendo de gran importancia esta evaluación para medir la inmunocompetencia de individuos. Una de las alternativas es la medición directa de las citoquinas en suero. Sin embargo, esta evaluación es sesgada debido a que el suero posee gran cantidad de inhibidores: proteínas dianas o receptores antagonistas y anticuerpos. Así, la evaluación en células mononucleares de sangre periférica (PBMC), es un método que ofrece ventajas para la evaluación de la inmunidad o respuesta inmune, con o sin estímulos externos, midiendo la inmunocompetencia o el estado de respuesta específica (Friberg et al., 1994; Whiteside, 1994). Se ha utilizado este método en camellos y alpacas, en la evaluación de la respuesta inmune, tanto para la evaluación de la respuesta inmune frente a inmunógenos bacterianos o proteínas simples hasta la evaluación de vacunas (More et al., 2013; Raquel Watanabe et al., 2014; Sulabh et al., 2019; Tambillo G. et al., 2014). En bovinos, utilizando la misma metodología se ha evaluado la capacidad de respuesta inmune tomando como variable la raza, para dar una posible respuesta de la capacidad de resistencia y/o susceptibilidad a enfermedades de algunas razas (Sulabh et al., 2019).

El sistema inmune ejerce una respuesta frente a la interacción de moléculas extrañas, que cuando provienen de microorganismo patógenos se denominan Patrones Moleculares Asociados a Patógenos (PAMPs), los cuales son reconocidos por receptores (PRR), y producen una respuesta a través de citoquinas de células linfoides como son linfocitos, monocitos y macrófagos en conjunto con los polimorfos nucleares y células epiteliales

(Tizard, 2013). No obstante, las células que conforman a las PBMC, de las cuales se medirá el efecto frente a las proteína recombinante y el vector, son principalmente linfocitos, monocitos y células asesinas naturales o NK (Kleiveland, 2015). Así, en el presente estudio, la expresión de Interferón gamma (IFN- γ), por leucocitos de sangre periférica de alpaca, a las 48 horas posterior a la exposición, solo el grupo Vector (3.87 ± 0.57) mostró niveles significativamente mayores en relación al control (2.13 ± 0.58). Esta respuesta podría estar relacionada al lipopolisacárido (LPS), que recubre la pared externa del vector, la cual ha mostrado ser un componente que estimula la respuesta de esta citoquina (Kleiveland, 2015; Tizard, 2013). Si bien, la proteína recombinante F17, por sí sola, no ha mostrado tener la capacidad suficiente para estimular la producción de IFN- γ , al menos hasta las 72 horas, tanto el Vector (5.00 ± 0.90) como la combinación Vector + F17 (4.10 ± 0.59), mostraron niveles mayores que los controles. Estas respuestas podrían explicarse a la naturaleza de respuesta de los linfocitos, los cuales producen una mejor respuesta frente a moléculas complejas, como son las proteínas unidas a carbohidratos y otro tipo de moléculas. Así, la combinación proteína purificada con el LPS del vector, muestra niveles significativamente mayores. Sin embargo, F17, por sí sola, no estimularía niveles suficientes al menos hasta las 72, a pesar de mostrar la tendencia a incrementarse, debido a que algunas proteínas, en relación a su estructura, estabilidad y la concentración utilizada, estimulan variablemente a los linfocitos (Tizard, 2013), similares respuestas de incremento de la expresión de IFN- γ *in vitro* en alpacas, se ha reportado usando proteínas purificadas *P6 like* de *Pasteurella* y antígenos clostridiales (Maximiliano G. et al., 2018b; More et al., 2013).

La producción de TNF- α , a las 48 y 72 horas, muestran niveles relativamente similares comparado con el control, frente a la proteína F17, vector y su combinación, no determinándose ninguna diferencia significativa, en la expresión de esta citoquina. Sin embargo, a las 72 horas se incrementan los niveles de esta citoquina por encima del control en los grupos de tratamiento, pero esta tendencia no consigue ser significativo, lo que no descarta su mayor respuesta en una evaluación con tiempos más prolongados. Si bien, TNF- α es una citoquina pro inflamatoria, es una citoquina producida principalmente por células de la inmunidad innata, como son los polimorfonucleares, en este caso, de acuerdo a la naturaleza de los tratamientos, una respuesta intensa de expresión de TNF- α , hubiera sido por los neutrófilos, que son células de la primera líneas de defensa (Tizard, 2013). Sin embargo, debemos considerar que en células de PBMC, utilizados en este tipo de evaluaciones, se han separado a los granulocitos, por ello, esta respuesta débil podría ser

explicada, debido a que los Linfocitos T y B, son células especializadas en la respuesta de antígenos expresando otro perfil de citoquinas, y considerando que los monocitos forman una mínimo porcentaje en el paquete celular de PBMC (Kleiveland, 2015; Tizard, 2013). Además, su expresión puede ser inhibida por IL-10 (Schandené et al., 1994), cuya citoquina fue expresada en niveles significativamente mayores en el presente estudio. Patrones similares, ofrece otros estudios, en cual frente a la proteína *P6 like*, se estimula levemente (Maximiliano et al., 2018); y frente a antígenos clostridiales, a determinadas concentraciones no frecen cambios significativos (Tambillo G. et al., 2014). Resultados similares se obtuvieron al inmunizar camellos con la vacuna *Brucella abortus* cepa 19, posterior a ello, se colectó la sangre para obtener PBMC, y realizar la expresión de citoquinas, obteniendo niveles bajos de TNF- α , en diferentes intervalos de tiempo (Odbileg et al., 2009).

La expresión de la interleucina 2 (IL-2), por leucocitos de sangre periférica de alpaca mostraron a las 48 horas posterior a la exposición de las proteínas F17, vector y su combinación, niveles significativamente mayores en relación al control, siendo el vector (6.54 ± 1.44) el de mayor expresión por encima de F17 (3.42 ± 0.96) y la combinación Vector + F17 (3.71 ± 0.94). Sin embargo, a las 72 horas, solo el vector (5.32 ± 1.77) muestra niveles significativamente mayores, mientras que, la proteína purificada F17 y la combinación Vector + F17, muestra la misma tendencia. Esta respuesta podría ser explicada debido a que IL-2 es el principal activador de Linfocitos T los cuales expresan el receptor de IL-2, y se expresan frente a la exposición o estímulos estructurales de microorganismos, incrementándose para la activación y como factor de crecimiento de linfocitos, considerando que PBMC está compuesto hasta por 85% por linfocitos, lo que generaría los niveles observados (Kleiveland, 2015; Malek, 2003; Tizard, 2013), niveles comparables a los expresados utilizando antígenos clostridiales y de pasteurelas, frente a la evaluación de la expresión *in vitro* (Maximiliano G. et al., 2018b; More et al., 2013; Raquel Watanabe et al., 2014).

En relación a la respuesta Th2, la expresión de la interleucina 4 (IL-4), por leucocitos de sangre periférica de alpaca, a las 48 horas posterior a la exposición, solo los grupos Vector (5.62 ± 1.12) y la combinación Vector + F17 (4.67 ± 0.42), mostraron niveles significativamente mayores en relación al control (2.82 ± 0.54). Mientras que, a las 72 horas, solo la combinación Vector + F17 (5.12 ± 0.93) expresaron niveles significativamente mayores, niveles similares a los obtenidos por Maximiliano y colaboradores (2018), en el cual entre las 24 y 48 horas obtiene niveles de hasta 8 veces la expresión. No obstante, la

proteína F17 no muestra niveles significativamente mayores resultado similar al obtenido al estímulo de antígenos clostridiales (More et al., 2013). IL-4, tiene como función la polarización de linfocitos T vírgenes hacia Th2, lo cual estimula su expansión y activación, siendo producida por Linfocitos T, principalmente. Así, esta respuesta podría deberse a la activación de Linfocitos por los estímulos antigénicos de los tratamientos, considerando que en PBMC, la principal población de Linfocitos son los linfocitos T vírgenes, dando respuesta frente al vector cuyo principal componente es el LPS y en combinación con la proteína recombinante F17, tanto a las 48 horas y 72 horas, lo que permitiría en combinación con otras citoquinas de Th2 una respuesta que induce la producción de anticuerpos (Choi and Reiser, 1998; Tizard, 2013). Si bien, se utilizó un sistema vivo, diferente al cultivo celular de PBMC utilizado en el presente estudio, pero con el mismo objetivo de evaluar la capacidad de estimular el sistema inmune utilizando una proteína recombinante de tipo fimbrial, a través de la medición de citoquinas, se obtuvieron resultados similares al presente estudio, obteniendo niveles de IL-4 predominantes sobre IFN- γ , expresados en bazo y placas de Peyer al inmunizar por vía oral ratones BALB/c, utilizando *Lactobacillus casei* expresando F41 de *Escherichia coli* enterotoxigénica (ETEC) (Liu et al., 2009).

La expresión de la interleucina 10 (IL-10), en PBMC de alpaca, a las 48 horas posterior a la exposición, evidenció que los grupos Vector (2.88 ± 1.23) y la combinación Vector + F17 (3.67 ± 0.97) mostraron niveles significativamente mayores en relación al control (0.98 ± 0.28). Mientras que, a las 72 horas, no hubo expresiones significativas, a pesar de tener niveles similares a las de 48 horas y con la misma tendencia. Esta expresión podría explicarse debido a que esta citoquina, tiene como función principal la inmunoregulación, y permite la inhibición de macrófagos y células asesinas naturales o NK, disminuyendo la respuesta Th1, actuando frente a niveles altos de IFN- γ (Schandené et al., 1994; Tizard, 2013), considerando que en el presente estudio se reporta niveles significativamente mayores de IFN- γ . No obstante, los niveles no son significativamente altos a las 72 horas. Utilizando antígenos clostridiales ha mostrado tener tendencias igual, incrementando sus niveles de expresión (More et al., 2013; Tambillo G. et al., 2014). De la misma forma, P6-like de *Pasteurella* incrementa niveles de IL-10 (Maximiliano et al., 2018).

El siguiente paso fue evaluar la inmunogenicidad de la proteína recombinante, F17 expresado en el vector, a través de la cuantificación de los niveles de anticuerpos específicos al antígeno vacunal de tipo IgG (subclases IgG1, IgG2a e IgG2b) e IgA en ratones BALB/c, utilizando la prueba de ELISA. IgG, es la inmunoglobulina de mayor importancia en

humanos y en muchos mamíferos, la deficiencia de alguna subclase de IgG, produce incapacidad para controlar algunos agentes infecciosos, mostrando cada subclase características funcionales importantes para una adecuada respuesta inmune (Vidarsson et al., 2014). La producción de inmunoglobulinas G total en ratones BALB/c posterior a la inmunización, produjo densidades ópticas (DO) relacionado con la producción de anticuerpos, significativamente mayores en el grupo de los inmunizados con la F17 en comparación a los grupos: Vector y Control. Obteniendo F17, a los días 14 (DO: 1.048), día 28 (DO:1.19) y al día 42 (DO:1.155), mientras que los grupos control y vector no superaron la DO: 0.534. Esta respuesta sostenida en los 3 periodos de evaluación podría ser explicada por la capacidad que posee la inmunidad de mucosas, cuya administración oral de la vacuna, estimula las células dendríticas del Epitelio Asociado a Folículos, que son sitios de inducción de la respuesta inmune, en el cual se absorben y/o reconocen antígenos para su procesamiento y en respuesta, producen niveles de Inmunoglobulina G e inmunoglobulina A (Zeng et al., 2016), siendo considerado las mucosas una vía de inmunización de gran importancia para la obtención de respuestas eficientes contra determinado microorganismo patógeno (Neutra and Kozlowski, 2006). Si bien, las proteínas recombinantes, o vacunas recombinantes, no son inmunogénicas o no generan respuestas eficientes como las vacunas vivas, se ha observado que mediante el uso de adyuvantes se potencia la capacidad del sistema inmune para reconocer los antígenos recombinantes seleccionados, produciéndose una respuesta eficiente medible en la cantidad de anticuerpos específicos (Cambronero et al., 2017). En este estudio se utiliza la proteína fimbrial recombinante de *Escherichia coli*, F17, expresado en un sistema de expresión bacteriano, *Escherichia coli* BL21, la cual es una cepa no patógena utilizada ampliamente en la producción de proteínas recombinantes. Sin embargo, en el presente estudio, se aprovecha el sistema de expresión, BL21, en la calidad de adyuvante, debido a que posee en su estructura externa las características de cualquier bacteria gramnegativa, especialmente el lipopolisacárido (LPS), lo cual ha mostrado ser un eficiente inmunoestimulante, utilizándose este sistema de expresión para la obtención de respuestas eficientes reflejados en niveles altos de anticuerpos específicos, lo que explicaría los niveles significativamente mayores de IgG total anti F17 (Gomes-Solecki and Richer, 2018). Además, se utilizó un protocolo estandarizado de inmunización oral en ratones, que ha ofrecido niveles de anticuerpos altos y protectivos, utilizado en proteínas recombinantes, como son OspA de *Borrelia burgdorferi* (Gomes-Solecki et al., 2006; Richer et al., 2011); lig A de *Leptospira interrogans* (Lourdault et al., 2014). Así, un estudio utilizando protocolos similares en cuanto a la vía de inmunización oral, y ratones BALB/c, utilizó *Lactobacillus*

casei expresando F41 de *Escherichia coli* enterotoxigénica (ETEC), el cual obtuvo niveles significativamente altos de IgG en suero (Liu et al., 2009). Además, otro estudio muy similar al presente, en el cual como sistema de expresión de proteína recombinante se utilizó a *Lactococcus lactis*, produciendo la proteína EspB, la cual fue suministrado vía oral para inmunizar ratones BALB/c, produjo niveles de IgG sistémicos muy altos, específicos contra *Escherichia coli* O157:H7 (Ahmed et al., 2014).

La producción de IgG total se incrementó significativamente. Por ello, la siguiente evaluación consistió en la medición o evaluación de la subclase de IgG. La producción de IgG1 en ratones BALB/c posterior a la inmunización, produjo densidades ópticas (DO) relacionado con la producción de anticuerpos, significativamente mayores en el grupo de los inmunizados con la F17 en comparación a los grupos: Vector y Control, obteniendo F17 al día 28 (DO: 0.337) y al día 42 (DO: 0.407). Los resultados del presente estudio muestran niveles relativamente bajos, a pesar de la diferencia significativa en el día 28 y 42, este comportamiento podría explicarse debido a que la producción de la subclase IgG1 en ratones está influenciada por la respuesta de Th2, cuyo efector es la citoquina IL4, la cual, en los resultados previos, obtuvimos niveles significativamente mayores, suficientes para estimular la diferencia observada. IgG1, tiene la capacidad de neutralizar toxinas y virus, pero falla o no puede unirse al complemento, lo que disminuye su eficiencia en el enfrentamiento frente a microorganismos bacterianos como son *Escherichia coli*, sin embargo, Th1 y TH2, se expresan a niveles variables, a pesar de la polarización o predominancia de un perfil, pero suficientes para inducir la expresión baja de las subclases como se observa en esta evaluación (Collins, 2016). Estos resultados difieren en la cantidad de producción de IgG1 frente a otro estudio, al inmunizar vía oral ratones BALB/c, utilizando *Lactobacillus casei* expresando F41 de *Escherichia coli* enterotoxigénica (ETEC), el cual obtuvo niveles altos de IgG1. Ésto se podría explicar debido a que la citoquina predominante obtenida en el mismo estudio, en bazo y placas de Peyer, fue la citoquina IL-4 (Liu et al., 2009).

IgG2a, IgG2b e IgG2c, tiene funciones similares. sin embargo. IgG2c no ha sido caracterizado completamente funcionalmente, ni se ha establecido el perfil de citoquinas que lo induce. Por ello, no se ha realizado la evaluación en este estudio. IgG2a, tiene una intensa afinidad hacia receptores Fc y activa el complemento, promoviendo la fagocitosis y citotoxicidad dependiente de anticuerpos, acción muy importante frente a la defensa contra bacterias. Además, se estableció desde el inicio que esta subclase, es la principal defensa frente a los virus, debido a que su producción es estimulada por IFN- γ (Collins, 2016). El en

presente estudio, niveles de IFN- γ , se incrementaron *in vitro*, lo que reforzaría la posible explicación sobre los niveles significativamente mayores en el presente estudio, en el cual, la producción de Ig2a en ratones BALB/c posterior a la inmunización, produjo densidades ópticas (DO) relacionado con la producción de anticuerpos, significativamente mayores en el grupo de los inmunizados con la F17 en comparación a los grupos: Vector y Control. Obteniendo F17 al día 14(DO: 0.530), 28 (DO: 0.755) y al día 42 (DO: 0.653).

La producción de Ig2b en ratones BALB/c posterior a la inmunización, produjo densidades ópticas (DO) relacionado con la producción de anticuerpos, significativamente mayores en el grupo de los inmunizados con la F17 en comparación a los grupos: Vector y Control. Obteniendo F17 al día 14(DO: 0.763), 28 (DO: 0.716) y al día 42 (DO: 0.751). De manera similar, a IgG2a, aunque con menos afinidad o intensidad IgG2b, se une a Fc y participa en la fagocitosis y la citotoxicidad dependiente de anticuerpos, otra diferencia reportada es que diferenciación está relacionada a antígenos de naturaleza carbohidratos y es producida mediante la vía T-independiente, siendo estimulada por TNF- β y responde al estímulo de IFN- γ , lo que es reportado en la evaluación *in vitro* en ensayos previos, lo que podría explicar su incremento significativo en los 3 tiempos evaluados posterior a la inmunización (Collins, 2016). Resultados similares se obtuvo al inmunizar vía oral ratones BALB/c, utilizando *Lactobacillus casei* expresando F41 de *Escherichia coli* enterotoxigénica (ETEC), si bien la subclase predominante fue IgG1, también se obtuvo niveles significativamente mayores de IgG2a/IgG2b (Liu et al., 2009).

La producción de anticuerpos frente a bacterias comensales y patógenos, en el tracto intestinal o mucosa intestinal, ha sido evaluada, y se ha observado niveles altos de IgA principalmente, además de la producción de IgG para la prevención de la expansión sistémica (Zeng et al., 2016). Por ello, en el presente estudio se evaluó los niveles de IgA producidos, los cuales fueron extraídos de las heces y cuantificados mediante ELISA, la producción de IgA en ratones BALB/c posterior a la inmunización, produjo densidades ópticas (DO) relacionado con la producción de anticuerpos, significativamente mayores en el grupo de los inmunizados con la F17 en comparación a los grupos: Vector y Control. Obteniendo F17 al día 14(DO: 0.962), 28 (DO: 0.909) y al día 42 (DO: 1.206). Estos resultados podrían explicarse debido a la naturaleza de la vacuna (Lipopolisacáridos y la proteína recombinante F17), la cual ha mostrado previamente, en la evaluación *in vitro*, el potencial inmunogénico. Además, de la gran capacidad de reconocimiento del Tejido linfoide Asociado a intestino (GALT), la cual está especializada en procesar antígenos selectivamente y como respuesta se

producen niveles altos de IgA secretorios, los cuales son los anticuerpos de mayor capacidad neutralizante y resistencia en las mucosas, debido a su dimerización o polimerización que lo hace más resistente a las proteasas (Neutra and Kozlowski, 2006; Siegrist, 2013; Zeng et al., 2016). Niveles altos de IgA, comparables al presente estudio, también se obtuvo al inmunizar vía oral ratones BALB/c, utilizando *Lactobacillus casei* expresando F41 de *Escherichia coli* enterotoxigénica (ETEC) (Liu et al., 2009). Resultados compatibles a los obtenidos utilizando *Lactococcus lactis* expresando EspB, la cual fue suministrado vía oral para inmunizar ratones BALB/c, en el cual se obtuvo en heces niveles altos de IgA específicos contra *Escherichia coli* O157:H7 (Ahmed et al., 2014). Niveles similares de IgA fue obtenido en otro estudio, en el cual se inmunizó con *E coli* F18 en lechones, obteniéndose niveles significativamente mayores en suero (Bertschinger et al., 2000).

Para evaluar la acción protectora de la proteína recombinante F-17 en los ratones BALB/C se utilizó una cepa de desafío EHEC, luego se midió la colonización a través de la carga de eliminación de bacterias de la cepa desafío en unidades formadoras de colonias (UFC/g) mediante un PCR en tiempo real utilizando como gen a la Shiga toxina para su cuantificación específica. La carga bacteriana en la heces (UFC/g) o eliminación fecal de la cepa de desafío está directamente relacionada a la colonización, lo que permite evaluar métodos de infección y/o la eficiencia de candidatos vacunales (Stromberg et al., 2018). En el presente estudio, los resultados muestran al día 02 que los tres grupos eliminaban la carga promedio de 10^5 UFC/g. Sin embargo, a los días 4 y 6, el grupo de Inmunizados con F17, disminuyó significativamente su carga $10^{5.1}$ y $10^{3.7}$, respectivamente, mientras que los grupos Control y Vector, mostraron cargas bacterianas altas, 10^7 y $10^{5.5}$, mientras que al día 08, todos los grupos redujeron su carga hasta 10^3 , esta respuesta podría ser explicada debido a los niveles de anticuerpos significativamente altos de IgA, específicos contra esta cepa EHEC F17, obtenidos en la evaluación previa mediante el inmunoensayo ELISA. IgA secretorios, que poseen la capacidad de neutralizar e inhibir la unión de las adhesinas fimbriales con su receptor, lo que repercutiría en la deficiencia de la interacción de la bacteria con células intestinales, lo que inhibiría, o al menos, disminuiría la colonización de EHEC F17, obteniéndose niveles reducidos en heces (Stromberg et al., 2018; Zeng et al., 2016). Resultados comparables con una evaluación de una vacuna oral, *Lactococcus lactis* produciendo la proteína recombinante EspB, inmunizando ratones BALB/c como en el presente estudio, redujo significativamente la eliminación fecal de *Escherichia coli* O157:H7 (Ahmed et al., 2014). Una reducción de la carga bacteriana fecal, similar al presente

estudio, fue obtenido cuando se inmunizó lechones contra *E coli* F18, obteniéndose cargas significativamente menores (Bertschinger et al., 2000); otra evaluación, en bovinos, en el cual inmunizaron con proteínas del sistema de secreción III de *Escherichia coli*, redujo la eliminación fecal de la cepa de desafío *E coli* O157: H7 (Potter et al., 2004); en ovinos, la administración oral de lactoferrin (LF), considerado un antimicrobiano e inmunomodulador, también redujo considerablemente la excreción fecal de *E coli* O157: H7 (Yekta et al., 2011a), resultado similar, por el mismo grupo de investigación, produjo la inmunización con proteínas EspA, EspB e Intimina reduciendo la carga fecal de la cepa de desafío (Yekta et al., 2011b). Los resultados del presente estudio muestran niveles relativamente bajos de carga bacteriana al día 07, 10^3 UFC/g, en ambos grupos, tanto inmunizados como el grupo control, este comportamiento podría explicarse debido a que el modelo murino, BALB/c a pesar de la carga o dosis infectiva, reduce los niveles de excreción fecal gradualmente durante los primeros 7 días, alcanzando niveles bajos por encima de 10^2 UFC/g al día 7, como muestra un estudio utilizando a *Escherichia coli* O157:H7, como cepa de desafío (Mohawk et al., 2010).

El procedimiento final, del presente estudio, fue evaluar la ganancia y/o pérdida de peso de los ratones BALB/c posterior al desafío con una cepa EHEC, en los grupos inmunizados y control. Debido a que la variación de peso es otro indicador importante de la eficiencia de la vacuna, principalmente en enfermedades que producen diarrea o procesos patológicos entéricos (Price and Holmes, 2012). Para ello, se midieron los pesos durante los 7 días posteriores al desafío, el peso del ratón al día del desafío, día 0, representó el 100%. Los resultados obtenidos muestran diferencias significativas durante los primeros 04 días, mostrando una diferencia en el tercer día de hasta un 10%, Inmunizados: 112.24 ± 1.33 y Control: 101.78 ± 2.57 . Los resultados muestran, que los animales no inmunizados o grupo control, disminuyen su peso significativamente los primeros 4 días, esta pérdida de peso podría explicarse debido a que no poseen niveles de anticuerpos IgA e IgG, específicos contra la cepa de desafío EHEC F17, lo que produce una colonización y alteración en su microbiota, induciendo a una inflamación local y malestar, que propicia un menor consumo y/o deficiencia en la absorción de nutriente, que se reflejan con la disminución del peso. Además, La colonización de la cepa de desafío, podría explicarse debido a los niveles altos encontrados de carga bacteriana UFC/g durante los 06 primeros días, hallados en la evaluación previa en el presente estudio. Sin embargo, los ratones del grupo inmunizados, en promedio, mantuvieron su peso significativamente en comparación con el grupo control,

debido a la inmunización que le confirió niveles altos de IgG e IgA específicos contra la cepa de desafío, y mostraron en las heces, cargas (UFC/g) significativamente menores, que explicarían la deficiencia en la colonización de la cepa de desafío, no alterando considerablemente la homeostasis intestinal, manteniendo su peso. Sin embargo, existe una leve disminución de la ganancia del peso de los animales inmunizados comparables con los ratones del grupo control al día 07, debido a la recuperación o ganancia de peso en el grupo control, la cual podría explicarse por la capacidad de los ratones BALB/c frente a la cepa de desafío relacionada a su microbiota, por lo cual has servido como modelo para estudios de colonización y virulencia (Mohawk et al., 2010). , Con un enfoque distinto, pero usando la variación de peso como indicador, un estudio inmunizando ratones con sub unidades de la toxina del cólera muestra disminución de la virulencia y protección contra la infección por *Vibrio cholerae*, en la cual los ratones inmunizados mostraron menores variaciones de peso y muerte, cuya eficacia se evaluó con tipos de inmunización: Intraperitoneal, intranasal e subcutáneo (Price et al., 2013).

Por lo tanto, el presente estudio muestra la capacidad inmunogénica de la proteína recombinante F17 con el sistema de expresión BL21 y su performance en la protección frente al desafío con EHEC en ratones BALB/c inmunizados vía oral, incrementando los niveles de anticuerpos específicos IgG e IgA, reduciendo la eliminación fecal o colonización, y mantiene la ganancia de peso al desafío. Por lo tanto, BL21+F17 podría ser considerado como un potencial candidato vacunal para la prevención de las diarreas en alpacas producidas por *Escherichia coli*.

VI. CONCLUSIONES

- Los patotipos de *Escherichia coli* que producen diarreas y casos fatales entéricos en centros alpaqueros de Puno son los Enteropatógenos (EPEC) y Productores de Shiga-toxina (STEC), los cuales poseen predominantemente la Fimbria F17.
- La secuencia de la región de adherencia de la fimbria F17 de *Escherichia coli* puede producirse eficientemente en sistemas de expresión de proteínas recombinantes.
- El Vector con la proteína recombinante F17 estimulan la producción de citoquinas de Th1 y Th2, principalmente INT- γ y IL-4 en células mononucleares de sangre periférica (PBMC) de alpaca
- La vacuna BL21-F17+ administrada vía oral en ratones BALB/c induce niveles significativamente mayores de IgG total e IgA, siendo las subclases IgG2a-IgG2b las predominantes de IgG.
- La vacuna BL21-F17+ administrada vía oral en ratones BALB/c mantiene la ganancia de peso y reduce significativamente la colonización/eliminación de una cepa de *Escherichia coli*(EHEC) aislada de alpaca.

VII. BIBLIOGRAFÍA

1. Abbas, A.K., Lichtman, A.H., Pillai, S., Preceded by: Abbas, A.K., 2017. Cellular and molecular immunology.
2. Ahmed, B., Loos, M., Vanrompay, D., Cox, E., 2014. Oral immunization with *Lactococcus lactis*-expressing EspB induces protective immune responses against *Escherichia coli* O157:H7 in a murine model of colonization. *Vaccine* 32, 3909–16. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2014.05.054>
3. Ameghino, E., DeMartini, J., 1991. Mortalidad de crías de alpacas. *Bol Div IVITA* 71–80.
4. Bardález C., C., Manchegdegmhjmo S., A., Lam Chiok C, K., Sandoval C, N., More B., J., Pezo C., D., Ramírez V., M., V., M.R., 2013. Cinética de expresión del factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) e interleucina 1 alfa (il-1 β) en mucosa intestinal de crías de alpaca (*vicugna pacos*) sanas y con enteropatía. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú* 24, 381–389. <https://doi.org/10.15381/rivep.v24i3.2588>
5. Barrios-Arpi, M., Morales C., S., Villacaqui-Ayllon, E., 2016. Susceptibilidad Antibiótica de Cepas de *Escherichia coli* en Crías de Alpaca con y sin Diarrea. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú* 27, 381.

<https://doi.org/10.15381/rivep.v27i2.11651>

6. Baxter, D., 2007. Active and passive immunity, vaccine types, excipients and licensing. *Occupational Medicine* 57, 552–556. <https://doi.org/10.1093/occmed/kqm110>
 7. Bejarano L., E., Manchego S., A., Castro S., G., Pérez G., G., Sandoval C., N., Ramírez V., M., 2017. Efecto de la Suplementación de L-Glutamina sobre la Expresión de Genes de la Respuesta Inmune Humoral de la Mucosa Intestinal de Crías de Alpacas (*Vicugna pacos*). *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú* 28, 387. <https://doi.org/10.15381/rivep.v28i2.13078>
 8. Bertschinger, H.U., Nief, V., Tschäpe, H., 2000. Active oral immunization of suckling piglets to prevent colonization after weaning by enterotoxigenic *Escherichia coli* with fimbriae F18. *Veterinary Microbiology* 71, 255–267. [https://doi.org/10.1016/S0378-1135\(99\)00166-2](https://doi.org/10.1016/S0378-1135(99)00166-2)
 9. Bihannic, M., Ghanbarpour, R., Auvray, F., Cavalié, L., Châtre, P., Boury, M., Brugère, H., Madec, J.Y., Oswald, E., 2014. Identification and detection of three new F17 fimbrial variants in *Escherichia coli* strains isolated from cattle. *Veterinary Research* 45, 1–12. <https://doi.org/10.1186/s13567-014-0076-9>
 10. Blanco, J., Blanco, M., Garabal, J.I., González, E.A., 1991. Enterotoxins, colonization factors and serotypes of enterotoxigenic *Escherichia coli* from humans and animals. *Microbiología (Madrid, Spain)* 7, 57–73.
 11. Blount, Z.D., 2015. The unexhausted potential of 1–12. <https://doi.org/10.7554/eLife.05826>
 12. Boris Lira, M., Sergio Cueva, M., José Rodríguez, G., Milder Ayón, S., Zanuzzi, C., Barbeito, C., Néstor Falcón, P., María Vásquez, C., 2012. Identificación de las células de paneth en el intestino delgado de alpacas en los primeros 21 días de edad. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú* 23, 138–146. <https://doi.org/10.15381/rivep.v23i2.893>
 13. Bouckennooghe, A.R., Jiang, Z.D., De La Cabada, F.J., Ericsson, C.D., DuPont, H.L., 2002. Enterotoxigenic *Escherichia coli* as cause of diarrhea among Mexican adults and US travelers in Mexico. *Journal of travel medicine* 9, 137–40.
 14. Bougu, C. Le, Bertin, Y., Bougu, C. Le, Afa, Y.B., Le, C., 1999. AFA and F17 adhesins produced by pathogenic *Escherichia coli* strains in domestic animals
- To cite this version: Review article AFA and F17 adhesins produced by

pathogenic *Escherichia coli* strains in domestic animals a Bouguénec.

15. Bouzari, S., Jafari, A., Aslani, M.M., 2012. *Escherichia coli*: A brief review of diarrheagenic pathotypes and their role in diarrheal diseases in Iran. *Iranian Journal of Microbiology* 4, 102–117.
16. Bravo de Rueda, C., 2006. Caracterización molecular de los genes *sxt1*, *sxt2* y *eae* de *E. coli* aisladas de alpacas neonatas con diarrea. Universidad Cayetano Heredia.
17. Bravo, P.W., Garnica, J., Fowler, M.E., 1997. Immunoglobulin G concentrations in periparturient llamas, alpacas and their crias. *Small Ruminant Research* 26, 145–149. [https://doi.org/10.1016/S0921-4488\(96\)00965-0](https://doi.org/10.1016/S0921-4488(96)00965-0)
18. Burga C., C., Manchego S., A., Castro S., G., Pérez G., G., Ramírez V., M., Sandoval C., N., 2017. Expresión de la Interleucina 10 (IL-10) y el Factor de Crecimiento Transformante Beta (TGF- β) en Mucosa Intestinal de Crías de Alpaca (*Vicugna pacos*). *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú* 28, 439. <https://doi.org/10.15381/rivep.v28i2.13082>
19. Cambronero, M.R., Prado-Cohrs, D., Lopez Sanroma, M., 2017. Basic immunological concepts applied to vaccination. *Vacunas (English Edition)* 18, 49–58. <https://doi.org/10.1016/j.vacune.2017.11.004>
20. Cebra, C.K., Mattson, D.E., Baker, R.J., Sonn, R.J., Dearing, P.L., 2003. Potential pathogens in feces from unweaned llamas and alpacas with diarrhea. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 223, 1806–8.
21. Choi, P., Reiser, H., 1998. IL-4: role in disease and regulation of production. *Clinical and experimental immunology* 113, 317–9. <https://doi.org/10.1046/J.1365-2249.1998.00690.X>
22. Cid, D., Martín-Espada, C., Maturrano, L., García, A., Luna, L., Rosadio, R., 2012. Diarrheagenic *Escherichia coli* strains isolated from young Peruvian alpacas (*Vicugna pacos*) with diarrhea, in: *Production in South American Camelids and Other Fibre Animals*. Pérez-Cabal, M.A., et al., Eds, pp. 223–228.
23. Cid, M.D., 2010. Sanidad de alpacas en la etapa neonatal. Editorial Complutense.
24. Clem, A.S., 2011. Fundamentals of vaccine immunology. *Journal of global infectious diseases* 3, 73–8. <https://doi.org/10.4103/0974-777X.77299>

25. Collins, A.M., 2016. IgG subclass co-expression brings harmony to the quartet model of murine IgG function. *Immunology and Cell Biology* 94, 949–954. <https://doi.org/10.1038/icb.2016.65>
26. Córdova, J.D., 2012. Cinética de expresión de inmunoglobulina A en el epitelio intestinal de crías de alpaca (*Vicugna pacos*) 25, 151–161.
27. Cox, E., Melkebeek, V., Devriendt, B., Goddeeris, B.M., 2014. Vaccines Against Enteric. *Caister Academic Press* 4, 255–270.
28. Croxen, M. a., Law, R.J., Scholz, R., Keeney, K.M., Wlodarska, M., Finlay, B.B., 2013. Recent Advances in Understanding Enteric Pathogenic *Escherichia coli*. *Clinical Microbiology Reviews* 26, 822–880. <https://doi.org/10.1128/CMR.00022-13>
29. Croxen, M.A., Finlay, B.B., 2010. Molecular mechanisms of *Escherichia coli* pathogenicity. *Nature Reviews Microbiology* 8, 26–38. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2265>
30. Curtis, B., Grassel, C., Laufer, R.S., Sears, K.T., Pasetti, M.F., Barry, E.M., Simon, R., 2016. Simple method for purification of enterotoxigenic *Escherichia coli* fimbriae. *Protein expression and purification* 119, 130–5. <https://doi.org/10.1016/j.pep.2015.11.007>
31. Davis, W.C., Heirman, L.R., Hamilton, M.J., Parish, S.M., Barrington, G.M., Loftis, A., Rogers, M., 2000. Flow cytometric analysis of an immunodeficiency disorder affecting juvenile llamas. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 74, 103–120.
32. Fernández-Baca, S., 2005. Situación actual de los camélidos sudamericanos en Perú. Proyecto de Cooperación Técnica en apoyo de la crianza y aprovechamiento de los Camélidos Sudamericanos en la Región Andina TCP/RLA/2914, Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO).
33. Fernández-Baca, S., 1991. Avances y perspectivas del conocimiento de los camélidos sudamericanos. Santiago.
34. Foster, A., Otter, A., Barlow, A.M., Pearson, G.R., Woodward, M.J., Higgins, R.J., 2008. Naturally occurring intestinal lesions in three alpacas (*Vicugna pacos*) caused by attaching and effacing *Escherichia coli*. *Veterinary Record* 162, 318–320. <https://doi.org/10.1136/vr.162.10.318>
35. Fowler, M.E., 1998. Medicine and surgery of South American camelids :

- llama, alpaca, vicuña, guanaco, 2nd ed. Ames : Iowa State University Press, Illinois.
36. Francis, D.H., Willgohe, J.A., 1991. Evaluation of a live avirulent *Escherichia coli* vaccine for K88+, LT+ enterotoxigenic colibacillosis in weaned pigs. *American journal of veterinary research* 52, 1051–5.
 37. Friberg, D., Bryant, J., Shannon, W., Whiteside', T.L., 1994. In Vitro Cytokine Production by Normal Human Peripheral Blood Mononuclear Cells as a Measure of Immunocompetence or the State of Activation.
 38. Garmendia, A.E., McGuire, T.C., 1987. Mechanism and isotypes involved in passive immunoglobulin transfer to the newborn alpaca (*Lama pacos*). *American journal of veterinary research* 48, 1465–71.
 39. Gomes-Solecki, M., Richer, L., 2018. Recombinant *E. coli* Dualistic Role as an Antigen-adjuvant Delivery Vehicle for Oral Immunization, in: *Methods in Molecular Biology* (Clifton, N.J.). pp. 347–357. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7383-5_27
 40. Gomes-Solecki, M.J.C., Brisson, D.R., Dattwyler, R.J., 2006. Oral vaccine that breaks the transmission cycle of the Lyme disease spirochete can be delivered via bait. *Vaccine* 24, 4440–4449. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2005.08.089>
 41. Greve, H.D.E., Cid, D., Sanz, R., Mari, I., 1999. Characterization of Nonenterotoxigenic *Escherichia coli* Strains Producing F17 Fimbriae Isolated from Diarrheic Lambs and Goat Kids 37, 1370–1375.
 42. Gyles, C.L., Prescott, J.F., Songer, J.G., Thoen, C.O., 2011. *Pathogenesis of Bacterial Infections in Animals*. Wiley.
 43. Hamers-Casterman, C., Atarhouch, T., Muyldermans, S., Robinson, G., Hammers, C., Songa, E.B., Bendahman, N., Hammers, R., 1993. Naturally occurring antibodies devoid of light chains. *Nature* 363, 446–448. <https://doi.org/10.1038/363446a0>
 44. Hur, J., Stein, B.D., Lee, J.H., 2012. A vaccine candidate for post-weaning diarrhea in swine constructed with a live attenuated *Salmonella* delivering *Escherichia coli* K88ab, K88ac, FedA, and FedF fimbrial antigens and its immune responses in a murine model. *Canadian Journal of Veterinary Research* 76, 186–194.
 45. INEI, 2012. IV Censo Nacional Agropecuario 2012 - Cuadros Estadísticos.

Existencia de ganado, aves, otros animales y colmenas Población de alpacas.

46. Kadwell, M., Fernandez, M., Stanley, H.F., Baldi, R., Wheeler, J.C., Rosadio, R., Bruford, M.W., 2001. Genetic analysis reveals the wild ancestors of the llama and the alpaca. *Proceedings. Biological sciences* 268, 2575–84. <https://doi.org/10.1098/rspb.2001.1774>
47. Kaper, J.B., Nataro, J.P., Mobley, H.L.T., 2004. Pathogenic *Escherichia coli*. *Nature Reviews Microbiology* 2, 123–140. <https://doi.org/10.1038/nrmicro818>
48. Khare, S., Alali, W., Zhang, S., Hunter, D., Pugh, R., Fang, F.C., Libby, S.J., Adams, L.G., 2010. Vaccination with attenuated *Salmonella enterica* Dublin expressing *E coli* O157:H7 outer membrane protein Intimin induces transient reduction of fecal shedding of *E coli* O157:H7 in cattle. *BMC veterinary research* 6, 35. <https://doi.org/10.1186/1746-6148-6-35>
49. Kleiveland, C.R., 2015. Peripheral Blood Mononuclear Cells, in: *The Impact of Food Bioactives on Health*. Springer International Publishing, Cham, pp. 161–167. https://doi.org/10.1007/978-3-319-16104-4_15
50. L, J.R.L., C, S.M., A, M.B., G, J.R., C, M.V., M, B.L., L, B.T., A, E.C., Espinoza, B., 2016. Patógenos Involucrados en Casos Fatales de Diarrea en Crías de Alpaca de la Sierra Central del Perú 27, 169–175.
51. Linnaeus, C., 1758. *Systema Naturae per regna tria Naturae, Secundum Classes, Ordines, Genera, Species cum Characteribus, Differentis, Synonymis, Locis*. Laurenti Salvii, Holmiae.
52. Liu, J.K., Hou, X.L., Wei, C.H., Yu, L.Y., He, X.J., Wang, G.H., Lee, J.S., Kim, C.J., 2009. Induction of immune responses in mice after oral immunization with recombinant *Lactobacillus casei* strains expressing enterotoxigenic *Escherichia coli* F41 fimbrial protein. *Applied and Environmental Microbiology* 75, 4491–4497. <https://doi.org/10.1128/AEM.02672-08>
53. Livak, K.J., Schmittgen, T.D., 2001. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta CT$ Method. *Methods* 25, 402–408. <https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>
54. Lourdault, K., Wang, L.-C., Vieira, A., Matsunaga, J., Melo, R., Lewis, M.S., Haake, D.A., Gomes-Solecki, M., 2014. Oral immunization with *Escherichia coli* expressing a lipidated form of LigA protects hamsters against challenge with *Leptospira interrogans* serovar Copenhageni. *Infection and immunity* 82,

893–902. <https://doi.org/10.1128/IAI.01533-13>

55. Luna-Pineda, V.M., Reyes-Grajeda, J.P., Cruz-Córdova, A., Saldaña-Ahuactzi, Z., Ochoa, S.A., Maldonado-Bernal, C., Cázares-Domínguez, V., Moreno-Fierros, L., Arellano-Galindo, J., Hernández-Castro, R., Xicohtencatl-Cortes, J., 2016. Dimeric and Trimeric Fusion Proteins Generated with Fimbrial Adhesins of Uropathogenic *Escherichia coli*. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* 6, 135. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2016.00135>
56. Luna, L., Rivera, H., Zanabria, V., Rosadio, R., 2012. Genotipificación , evaluación toxigénica in vitro y sensibilidad a antibióticos de cepas de *Escherichia coli* aisladas de casos diarreicos y fatales en alpacas neonatas. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú* 23, 280–288.
57. Luppi, A., 2017. Swine enteric colibacillosis: diagnosis, therapy and antimicrobial resistance. *Porcine Health Management* 3, 16. <https://doi.org/10.1186/s40813-017-0063-4>
58. Mainil, J.G., Gérardin, J., Jacquemin, E., 2000. Identification of the F17 fimbrial subunit- and adhesin-encoding (f17A and f17G) gene variants in necrotoxicogenic *Escherichia coli* from cattle, pigs and humans. *Veterinary Microbiology* 73, 327–335. [https://doi.org/10.1016/S0378-1135\(00\)00179-6](https://doi.org/10.1016/S0378-1135(00)00179-6)
59. Malek, T.R., 2003. The main function of IL-2 is to promote the development of T regulatory cells. *Journal of Leukocyte Biology* 74, 961–965. <https://doi.org/10.1189/jlb.0603272>
60. Matías, J., Berzosa, M., Pastor, Y., Irache, J., Gamazo, C., 2017. Maternal Vaccination. Immunization of Sows during Pregnancy against ETEC Infections. *Vaccines* 5, 48. <https://doi.org/10.3390/vaccines5040048>
61. Maximiliano G., J., Maturrano H., L., Castillo D., H., Guzmán M., K., Pérez J., D., Luna E., L., Puray C., N., Rosadio A., R., 2018a. Concentraciones de inmunoglobulina G sérica en alpacas neonatas muertas por enterotoxemia. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú* 29, 635. <https://doi.org/10.15381/rivep.v29i2.14479>
62. Maximiliano G., J., Maturrano H., L., Luna E., L., Hurtado C., R., Chero O., A., Rosadio A., R., A., R.R., 2018b. Evaluación de la inmunogenicidad de una proteína recombinante de una *Pasteurella multocida* aislada de alpacas con neumonía. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú* 29, 339. <https://doi.org/10.15381/rivep.v29i1.14197>

63. Maximiliano, J., Maturrano H., L., Luna E., L., Hurtado C., R., Chero O., A., Rosadio A., R., A., R.R., 2018. Evaluación de la inmunogenicidad de una proteína recombinante de una *Pasteurella multocida* aislada de alpacas con neumonía. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú* 29, 339. <https://doi.org/10.15381/rivep.v29i1.14197>
64. Mercado, E.C., Rodríguez, S.M., Elizondo, A.M., Marcoppido, G., Parreño, V., 2004. Isolation of shiga toxin-producing *Escherichia coli* from a South American camelid (*Lama guanicoe*) with diarrhea. *Journal of clinical microbiology* 42, 4809–11. <https://doi.org/10.1128/JCM.42.10.4809-4811.2004>
65. MINAGRI, 2017. Situación de las actividades de crianza y producción. Camélidos sudamericanos [WWW Document]. URL <http://www.minagri.gob.pe/portal/objetivos/40-sector-agrario/situacion-de-las-actividades-de-crianza-y-produccion/298-camelidos-sudamericanos?start=4>
66. Mohawk, K.L., Melton-Celsa, A.R., Zangari, T., Carroll, E.E., O'Brien, A.D., 2010. Pathogenesis of *Escherichia coli* O157:H7 strain 86-24 following oral infection of BALB/c mice with an intact commensal flora. *Microbial Pathogenesis* 48, 131–142. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2010.01.003>
67. Mohawk, K.L., O'Brien, A.D., 2011. Mouse Models of *Escherichia coli* O157:H7 Infection and Shiga Toxin Injection. *Journal of Biomedicine and Biotechnology* 2011, 1–17. <https://doi.org/10.1155/2011/258185>
68. Moon, H.W., Bunn, T.O., 1993. Vaccines for preventing enterotoxigenic *Escherichia coli* infections in farm animals. *Vaccine* 11, 213–220. [https://doi.org/10.1016/0264-410X\(93\)90020-X](https://doi.org/10.1016/0264-410X(93)90020-X)
69. Morales, S., Paredes, L., 2007. Asociación de Rotavirus y *Escherichia coli* fimbriada como agentes causales de infecciones entéricas en alpacas y enteropatógena. *Medicina* 18, 150–153.
70. More B., J., Manchego S., A., Sandoval C., N., Ramírez V., M., Pezo C., D., Chiok C., K.L., Rivera G., H., G., H.R., 2012. Detección genómica y expresión de péptidos antimicrobianos (a- y b-defensinas) en mucosa intestinal de crías de alpaca (*vicugna pacos*). *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú* 22, 324–335. <https://doi.org/10.15381/rivep.v22i4.332>
71. More, J., Alberto, M., Hermelinda, R., Nieves, S., Mercy, R., Kim Lam, C., Roberto, L., Carla, B., 2013. Expression of cytokines that regulate immune

- responses in alpaca (*Vicugna pacos*) blood leukocytes stimulated by clostridial antigens and retinoic acid. *Frontiers in Immunology* 4. <https://doi.org/10.3389/conf.fimmu.2013.02.00318>
72. Mori, L., Perales, R., Rodríguez, J., Shiva, C., Koga, Y., Choquehuanca, G., Palacios, C., 2014. Molecular Identification of Shiga-Toxin Producing and Enteropathogenic <i>Escherichia coli</i> (STEC and EPEC) in Diarrheic and Healthy Young Alpacas. *Advances in Microbiology* 04, 360–364. <https://doi.org/10.4236/aim.2014.47043>
 73. Moser, M., Leo, O., 2010. Key concepts in immunology. *Vaccine* 28, 2–13. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2010.07.022>
 74. Nagy, B., Fekete, P.Z., 1999. Enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC) in farm animals. *Veterinary Research* 30, 259–284. [https://doi.org/10.1016/S0928-4249\(99\)80020-0](https://doi.org/10.1016/S0928-4249(99)80020-0)
 75. Neutra, M.R., Kozlowski, P.A., 2006. Mucosal vaccines: The promise and the challenge. *Nature Reviews Immunology* 6, 148–158. <https://doi.org/10.1038/nri1777>
 76. Nguyen, T.D., Vo, T.T., Vu-Khac, H., 2011. Virulence factors in *Escherichia coli* isolated from calves with diarrhea in Vietnam. *Journal of Veterinary Science* 12, 159–164. <https://doi.org/10.4142/jvs.2011.12.2.159>
 77. Nowak, R., 1991. *Walker's Mammals of the world*. Johns Hopkins University Press 1629.
 78. Odbileg, R., Wu, S.L., Zhu, C.H., Zhu, J., Zhu, G.Q., ODBILEG, R., PUREVTSEREN, B., GANTSETSEG, D., BOLDBAATAR, B., BUYANNEMEKH, T., GALMANDAKH, Z., ERDENEBAATAR, J., KONNAI, S., ONUMA, M., OHASHI, K., 2009. Cytokine Responses in Camels (*Camelus bactrianus*) Vaccinated with *Brucella abortus* strain 19 Vaccine. *Journal of Veterinary Medical Science* 70, 587–592. <https://doi.org/10.1007/BF03175150>
 79. Ojeniyi, B., Ahrens, P., Meyling, A., 1994. Fimbrial and Toxin Genes in. *Journal of Veterinary Medicine* 41, 49–59.
 80. Palacios, C., Perales C., R., Chavera C., A., López U., T., 1999. Caracterización anátomo-histopatológica de enteropatías causantes de mortalidad en crías de alpaca. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú* 16, 34–40.

81. Perez, D., 2006. Genotipificación y subtipificación de *Clostridium perfringens* aislados de crías de alpacas muertas por enterotoxemia.
82. Potter, A.A., Klashinsky, S., Li, Y., Frey, E., Townsend, H., Rogan, D., Erickson, G., Hinkley, S., Klopfenstein, T., Moxley, R.A., Smith, D.R., Finlay, B.B., 2004. Decreased shedding of *Escherichia coli* O157:H7 by cattle following vaccination with type III secreted proteins. *Vaccine* 22, 362–369. <https://doi.org/10.1016/J.VACCINE.2003.08.007>
83. Price, G.A., Holmes, R.K., 2012. Evaluation of TcpF-A2-CTB Chimera and Evidence of Additive Protective Efficacy of Immunizing with TcpF and CTB in the Suckling Mouse Model of Cholera. *PLoS ONE* 7, e42434. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0042434>
84. Price, G.A., McFann, K., Holmes, R.K., 2013. Immunization with Cholera Toxin B Subunit Induces High-Level Protection in the Suckling Mouse Model of Cholera. *PLoS ONE* 8, e57269. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0057269>
85. Ramirez, A., 1991. Enfermedades infecciosas. En: Fernández-Baca S (ed). Avances y perspectivas del conocimiento de los camélidos sudamericanos. Santiago de Chile, in: FAO. pp. 263–324.
86. Ramírez, A., Franco, E., Pezo, D., García, W., 1998. Diagnóstico y control de enfermedades en CSA. *Pub. Tec. FMV* 34 9–14.
87. Raquel Watanabe, W., Alberto Manchego, S., Hermelinda Rivera, G., 2014. Expresión in vitro de las interleucinas 2 y 10 de linfocitos de alpacas (*Vicugna pacos*) en presencia de antígenos clostridiales. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú* 25, 419–429.
88. Richer, L.M., Aroso, M., Contente-Cuomo, T., Ivanova, L., Gomes-Solecki, M., 2011. Reservoir targeted vaccine for lyme borreliosis induces a yearlong, neutralizing antibody response to OspA in white-footed mice. *Clinical and Vaccine Immunology* 18, 1809–1816. <https://doi.org/10.1128/CVI.05226-11>
89. Roca L., V., Manchego S., A., Sandoval C., N., Lam Chiok C., K., Rivera G., H., G., H.R., 2014. Caracterización histológica y dinámica linfoide de las placas de peyer en crías de alpaca durante los 45 primeros días de vida. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú* 25, 341–349. <https://doi.org/10.15381/rivep.v25i3.10112>
90. Rojas, M., Manchego, A., Rocha, C.B., Fornells, L.A., Silva, R.C., Mendes,

- G.S., Dias, H.G., Sandoval, N., Pezo, D., Santos, N., 2016. Outbreak of diarrhea among preweaning alpacas (*Vicugna pacos*) in the southern peruvian highland. *Journal of Infection in Developing Countries* 10, 269–274. <https://doi.org/10.3855/jidc.7398>
91. Rosadio, A., Maturrano, H., Pérez, J., Luna, E., 2012. El complejo entérico neonatal en alpacas andinas. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Peru* 23, 261–271.
 92. Rosadio, R.H., Ameghino, E.F., 1994. Coccidial infections in neonatal Peruvian alpacas. *The Veterinary record* 135, 459–60.
 93. Rosano, G.L., Ceccarelli, E.A., 2014. Recombinant protein expression in *Escherichia coli*: advances and challenges. *Frontiers in Microbiology* 5, 172. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00172>
 94. Schandené, L., Alonso-Vega, C., Willems, F., Gérard, C., Delvaux, A., Velu, T., Devos, R., de Boer, M., Goldman, M., 1994. B7/CD28-dependent IL-5 production by human resting T cells is inhibited by IL-10. *Journal of immunology* (Baltimore, Md. : 1950) 152, 4368–74. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.180.9.5771>
 95. Siegrist, C.-A., 2013. Vaccine immunology. *Vaccines* 14–32. <https://doi.org/10.1016/B978-1-4557-0090-5.00004-5>
 96. Siuce, J., Manchego S., A., Sandoval C., N., More B., J., Chiok C., K.-L., Pezo C., D., Rivera G, H., 2015. Expresión de Defensinas en Yeyuno de Crías de Alpacas (*Vicugna pacos*) con Enteropatías. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú* 26, 317. <https://doi.org/10.15381/rivep.v26i2.11093>
 97. Smith, K.A., 2011. Edward jenner and the small pox vaccine. *Frontiers in immunology* 2, 21. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2011.00021>
 98. Stromberg, Z.R., Van Goor, A., Redweik, G.A.J., Wymore Brand, M.J., Wannemuehler, M.J., Mellata, M., 2018. Pathogenic and non-pathogenic *Escherichia coli* colonization and host inflammatory response in a defined microbiota mouse model. *Disease models & mechanisms* 11, dmm035063. <https://doi.org/10.1242/dmm.035063>
 99. Sulabh, S., Panigrahi, M., Kumar, S., Varshney, R., Verma, A., Baba, N.A., Gupta, J.P., Chauhan, A., Kumar, P., Dutt, T., Bhushan, B., 2019. Differential cytokine response of *Escherichia coli* lipopolysaccharide stimulated peripheral blood mononuclear cells in crossbred cattle, Tharparkar cattle and Murrah

- buffalo - An in vitro study. Spanish Journal of Agricultural Research 17, e0501. <https://doi.org/10.5424/sjar/2019171-12599>
100. Tambillo G., L., Manchego S., A., Chiok C., K.-L., Sandoval C., N., More B., J., Rivera G., H., G., H.R., 2014. Evaluación in vitro de la respuesta leucocitaria de alpacas (vicugna pacos) en presencia de antígenos clostridiales. Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú 24, 510–523. <https://doi.org/10.15381/rivep.v24i4.2742>
 101. Tiels, P., Verdonck, F., Coddens, A., Goddeeris, B., Cox, E., 2008. The excretion of F18 + E . coli is reduced after oral immunisation of pigs with a FedF and F4 fimbriae conjugate 2154–2163. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2008.01.054>
 102. Tizard, I.R., 2013. Veterinary immunology. Elsevier/Saunders.
 103. Van den Broeck, W., Cox, E., Goddeeris, B.M., 1999. Receptor-dependent immune responses in pigs after oral immunization with F4 fimbriae. Infection and immunity 67, 520–6.
 104. Verdonck, F., Tiels, P., van Gog, K., Goddeeris, B.M., Lycke, N., Clements, J., Cox, E., 2007. Mucosal immunization of piglets with purified F18 fimbriae does not protect against F18+ Escherichia coli infection. Veterinary Immunology and Immunopathology 120, 69–79. <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2007.06.018>
 105. Vidarsson, G., Dekkers, G., Rispens, T., 2014. IgG subclasses and allotypes: from structure to effector functions. Frontiers in immunology 5, 520. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2014.00520>
 106. Vilte, D.A., Larzábal, M., Mayr, U.B., Garbaccio, S., Gammella, M., Rabinovitz, B.C., Delgado, F., Meikle, V., Cantet, R.J.C., Lubitz, P., Lubitz, W., Cataldi, A., Mercado, E.C., 2012. A systemic vaccine based on Escherichia coli O157:H7 bacterial ghosts (BGs) reduces the excretion of E. coli O157:H7 in calves. Veterinary Immunology and Immunopathology 146, 169–176. <https://doi.org/10.1016/J.VETIMM.2012.03.002>
 107. Vu-Khac, H., Holoda, E., Pilipcinec, E., Blanco, M., Blanco, J.E., Dahbi, G., Mora, a., López, C., González, E. a., Blanco, J., 2007. Serotypes, virulence genes, intimin types and PFGE profiles of Escherichia coli isolated from piglets with diarrhoea in Slovakia. Veterinary Journal 174, 176–187. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2006.05.019>

108. Wernery, U., 2001. Camelid immunoglobulins and their importance for the new-born - A review. *Journal of Veterinary Medicine, Series B* 48, 561–568. <https://doi.org/10.1046/j.1439-0450.2001.00478.x>
109. Wheeler, J.C., 2006. Proyecto Identificación y rescate de alpacas genéticamente puras de la amenaza de extinción. Informe Final, INCAGRO.
110. Whitehead, C.E., Anderson, D.E., 2006. Neonatal diarrhea in llamas and alpacas. *Small Ruminant Research* 61, 207–215. <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2005.07.012>
111. Whiteside, T.L., 1994. Cytokines and Cytokine Measurements in a Clinical Laboratory, *CLINICAL AND DIAGNOSTIC LABORATORY IMMUNOLOGY*.
112. Wolf, M.K., 1997. Occurrence, distribution, and associations of O and H serogroups, colonization factor antigens, and toxins of enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Clinical microbiology reviews* 10, 569–84.
113. Wray, C., McLaren, I., Carroll, P., 1993. *Escherichia coli* isolated from farm animals in England and Wales between 1986 and 1991. *Veterinary Record* 133, 439–42.
114. Yekta, M., Cox, E., Goddeeris, B.M., Vanrompay, D., 2011a. Reduction of *Escherichia coli* O157: H7 excretion in sheep by oral lactoferrin administration 150, 373–378. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2011.02.052>
115. Yekta, M., Goddeeris, B.M., Vanrompay, D., Cox, E., 2011b. Immunization of sheep with a combination of intiminy, EspA and EspB decreases *Escherichia coli* O157:H7 shedding. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 140, 42–46. <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2010.11.010>
116. Zeng, M.Y., Cisalpino, D., Varadarajan, S., Hellman, J., Shaw Warren, H., Cascalho, M., Inohara, N., Núñez, G., 2016. Gut Microbiota-Induced Immunoglobulin G Controls Systemic Infection by Symbiotic Bacteria and Pathogens. *Immunity* 44, 647–658. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2016.02.006>
117. Zhang, H., Xu, Y., Zhang, Z., You, J., Yang, Y., Li, X., 2018. Protective immunity of a Multivalent Vaccine Candidate against piglet diarrhea caused by enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC) in a pig model. *Vaccine* 36, 723–728. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2017.12.026>

VIII. ANEXOS

8.1. Resultados del Análisis Estadístico

8.1.1 Cuantificación de anticuerpos

TEST DE NORMALIDAD

Number of values	28	28	40
Minimum	0.2240	0.2340	0.2610
25% Percentile	0.3375	0.3248	0.8255
Median	0.4845	0.4010	1.104
75% Percentile	0.5293	0.4738	1.248
Maximum	0.7640	0.8070	2.477
Mean	0.4608	0.4133	1.091
Std. Deviation	0.1343	0.1305	0.5263
Std. Error of Mean	0.02539	0.02467	0.08321
Lower 95% CI of mean	0.4087	0.3627	0.9226
Upper 95% CI of mean	0.5128	0.4639	1.259
Sum	12.90	11.57	43.64
D'Agostino & Pearson normality test			
K2	0.5153	8.519	6.528
P value	0.7729	0.0141	0.0382
Passed normality test (alpha=0.05)?	Yes	No	No
P value summary	ns	*	*
Shapiro-Wilk normality test			
W	0.9651	0.9242	0.9084
P value	0.4578	0.0442	0.0034
Passed normality test (alpha=0.05)?	Yes	No	No
P value summary	ns	*	**

8.1.1.1 IgG

D'Agostino & Pearson normality test			
K2	0.5153	8.519	6.528
P value	0.7729	0.0141	0.0382
Passed normality test (alpha=0.05)?	Yes	No	No
P value summary	ns	*	*
Shapiro-Wilk normality test			
W	0.9651	0.9242	0.9084
P value	0.4578	0.0442	0.0034
Passed normality test (alpha=0.05)?	Yes	No	No
P value summary	ns	*	**

8.1.1.1.1 Día 0

Kruskal-Wallis test	
P value	0.3480
Exact or approximate P value?	Approximate
P value summary	ns
Do the medians vary signif. (P < 0.05)?	No
Number of groups	3
Kruskal-Wallis statistic	2.111
Data summary	
Number of treatments (columns)	3
Number of values (total)	24

Dunn's multiple comparisons test	Mean rank diff.	Significant?	Summary	Adjusted P Value	
Control vs. Vector	4	No	ns	0.8698	A-B
Control vs. Vacunados	-0.9143	No	ns	>0.9999	A-C
Vector vs. Vacunados	-4.914	No	ns	0.4754	B-C
Test details	Mean rank 1	Mean rank 2	Mean rank diff.	n1	n2
Control vs. Vector	13.29	9.286	4	7	7
Control vs. Vacunados	13.29	14.2	-0.9143	7	10
Vector vs. Vacunados	9.286	14.2	-4.914	7	10

8.1.1.1.2 Día 14

Kruskal-Wallis test	
P value	0.0002
Exact or approximate P value?	Approximate
P value summary	***
Do the medians vary signif. (P < 0.05)?	Yes
Number of groups	3
Kruskal-Wallis statistic	16.81
Data summary	
Number of treatments (columns)	3
Number of values (total)	24

Dunn's multiple comparisons	Mean rank diff.	Significant?	Summary	Adjusted P Value	
-----------------------------	-----------------	--------------	---------	------------------	--

test					
Control vs. Vector	-0.4286	No	ns	>0.9999	A-B
Control vs. Vacunados	-12.21	Yes	**	0.0014	A-C
Vector vs. Vacunados	-11.79	Yes	**	0.0022	B-C
Test details	Mean rank 1	Mean rank 2	Mean rank diff.	n1	n2
Control vs. Vector	7.286	7.714	-0.4286	7	7
Control vs. Vacunados	7.286	19.5	-12.21	7	10
Vector vs. Vacunados	7.714	19.5	-11.79	7	10

8.1.1.1.3 Día 28

Kruskal-Wallis test	
P value	0.0002
Exact or approximate P value?	Approximate
P value summary	***
Do the medians vary signif. (P < 0.05)?	Yes
Number of groups	3
Kruskal-Wallis statistic	17.44
Data summary	
Number of treatments (columns)	3
Number of values (total)	24

Dunn's multiple comparisons test	Mean rank diff.	Significant?	Summary	Adjusted P Value	
Control vs. Vector	3	No	ns	>0.9999	A-B
Control vs. Vacunados	-10.5	Yes	**	0.0077	A-C
Vector vs. Vacunados	-13.5	Yes	***	0.0003	B-C
Test details	Mean rank 1	Mean rank 2	Mean rank diff.	n1	n2
Control vs. Vector	9	6	3	7	7
Control vs. Vacunados	9	19.5	-10.5	7	10
Vector vs. Vacunados	6	19.5	-13.5	7	10

8.1.1.1.4 Día 42

Kruskal-Wallis test	
P value	0.0002
Exact or approximate P value?	Approximate
P value summary	***
Do the medians vary signif. (P < 0.05)?	Yes
Number of groups	3
Kruskal-Wallis statistic	16.87
Data summary	
Number of treatments (columns)	3
Number of values (total)	24

Dunn's multiple comparisons test	Mean rank diff.	Significant?	Summary	Adjusted P Value	
Control vs. Vector	1	No	ns	>0.9999	A-B

Control vs. Vacunados	-11.5	Yes	**	0.0029	A-C
Vector vs. Vacunados	-12.5	Yes	**	0.0010	B-C
Test details	Mean rank 1	Mean rank 2	Mean rank diff.	n1	n2
Control vs. Vector	8	7	1	7	7
Control vs. Vacunados	8	19.5	-11.5	7	10
Vector vs. Vacunados	7	19.5	-12.5	7	10

8.1.1.2 IgG1

8.1.1.2.1 Día 0

Kruskal-Wallis test	
P value	0.9167
Exact or approximate P value?	Approximate
P value summary	ns
Do the medians vary signif. (P < 0.05)?	No
Number of groups	3
Kruskal-Wallis statistic	0.1739
Data summary	
Number of treatments (columns)	3
Number of values (total)	24

Dunn's multiple comparisons test	Mean rank diff.	Significant?	Summary	Adjusted P Value	
Control vs. Vector	-0.6429	No	ns	>0.9999	A-B
Control vs. Vacunados	0.7929	No	ns	>0.9999	A-C
Vector vs. Vacunados	1.436	No	ns	>0.9999	B-C
Test details	Mean rank 1	Mean rank 2	Mean rank diff.	n1	n2
Control vs. Vector	12.64	13.29	-0.6429	7	7
Control vs. Vacunados	12.64	11.85	0.7929	7	10
Vector vs. Vacunados	13.29	11.85	1.436	7	10

8.1.1.2.2 Día 14

Kruskal-Wallis test	
P value	0.0026
Exact or approximate P value?	Approximate
P value summary	**
Do the medians vary signif. (P < 0.05)?	Yes
Number of groups	3
Kruskal-Wallis statistic	11.92
Data summary	
Number of treatments (columns)	3
Number of values (total)	24

Dunn's multiple comparisons test	Mean rank diff.	Significant?	Summary	Adjusted P Value	
Control vs. Vector	-5.714	No	ns	0.3917	A-B

Control vs. Vacunados	-11.94	Yes	**	0.0018	A-C
Vector vs. Vacunados	-6.229	No	ns	0.2216	B-C
Test details	Mean rank 1	Mean rank 2	Mean rank diff.	n1	n2
Control vs. Vector	5.857	11.57	-5.714	7	7
Control vs. Vacunados	5.857	17.8	-11.94	7	10
Vector vs. Vacunados	11.57	17.8	-6.229	7	10

8.1.1.2.3 Día 28

Kruskal-Wallis test	
P value	0.0003
Exact or approximate P value?	Approximate
P value summary	***
Do the medians vary signif. (P < 0.05)?	Yes
Number of groups	3
Kruskal-Wallis statistic	15.97
Data summary	
Number of treatments (columns)	3
Number of values (total)	24

Dunn's multiple comparisons test	Mean rank diff.	Significant?	Summary	Adjusted P Value	
Control vs. Vector	-1.286	No	ns	>0.9999	A-B
Control vs. Vacunados	-12.3	Yes	**	0.0012	A-C
Vector vs. Vacunados	-11.01	Yes	**	0.0047	B-C
Test details	Mean rank 1	Mean rank 2	Mean rank diff.	n1	n2
Control vs. Vector	7	8.286	-1.286	7	7
Control vs. Vacunados	7	19.3	-12.3	7	10
Vector vs. Vacunados	8.286	19.3	-11.01	7	10

8.1.1.2.3 Día 42

Kruskal-Wallis test	
P value	0.0001
Exact or approximate P value?	Approximate
P value summary	***
Do the medians vary signif. (P < 0.05)?	Yes
Number of groups	3
Kruskal-Wallis statistic	17.62
Data summary	
Number of treatments (columns)	3
Number of values (total)	24

Dunn's multiple comparisons test	Mean rank diff.	Significant?	Summary	Adjusted P Value	
Control vs. Vector	-4.286	No	ns	0.7702	A-B
Control vs. Vacunados	-13.97	Yes	***	0.0002	A-C
Vector vs. Vacunados	-9.686	Yes	*	0.0163	B-C

Test details	Mean rank 1	Mean rank 2	Mean rank diff.	n1	n2
Control vs. Vector	5.429	9.714	-4.286	7	7
Control vs. Vacunados	5.429	19.4	-13.97	7	10
Vector vs. Vacunados	9.714	19.4	-9.686	7	10

8.1.1.3 IgG2a

8.1.1.3.1 Día 0

Kruskal-Wallis test	
P value	0.2591
Exact or approximate P value?	Approximate
P value summary	ns
Do the medians vary signif. (P < 0.05)?	No
Number of groups	3
Kruskal-Wallis statistic	2.701
Data summary	
Number of treatments (columns)	3
Number of values (total)	24

Dunn's multiple comparisons test	Mean rank diff.	Significant?	Summary	Adjusted P Value	
Control vs. Vector	0.4286	No	ns	>0.9999	A-B
Control vs. Vacunados	-4.586	No	ns	0.5646	A-C
Vector vs. Vacunados	-5.014	No	ns	0.4505	B-C
Test details	Mean rank 1	Mean rank 2	Mean rank diff.	n1	n2
Control vs. Vector	10.71	10.29	0.4286	7	7
Control vs. Vacunados	10.71	15.3	-4.586	7	10
Vector vs. Vacunados	10.29	15.3	-5.014	7	10

8.1.1.3.2 Día 14

Kruskal-Wallis test	
P value	0.0002
Exact or approximate P value?	Approximate
P value summary	***
Do the medians vary signif. (P < 0.05)?	Yes
Number of groups	3
Kruskal-Wallis statistic	16.81
Data summary	
Number of treatments (columns)	3
Number of values (total)	24

Dunn's multiple comparisons test	Mean rank diff.	Significant?	Summary	Adjusted P Value	
Control vs. Vector	0.4286	No	ns	>0.9999	A-B
Control vs. Vacunados	-11.79	Yes	**	0.0022	A-C
Vector vs. Vacunados	-12.21	Yes	**	0.0014	B-C

Test details	Mean rank 1	Mean rank 2	Mean rank diff.	n1	n2
Control vs. Vector	7.714	7.286	0.4286	7	7
Control vs. Vacunados	7.714	19.5	-11.79	7	10
Vector vs. Vacunados	7.286	19.5	-12.21	7	10

8.1.1.3.3 Día 28

Kruskal-Wallis test	
P value	0.0002
Exact or approximate P value?	Approximate
P value summary	***
Do the medians vary signif. (P < 0.05)?	Yes
Number of groups	3
Kruskal-Wallis statistic	17.12
Data summary	
Number of treatments (columns)	3
Number of values (total)	24

Dunn's multiple comparisons test	Mean rank diff.	Significant?	Summary	Adjusted P Value	
Control vs. Vector	-2.143	No	ns	>0.9999	A-B
Control vs. Vacunados	-13.07	Yes	***	0.0005	A-C
Vector vs. Vacunados	-10.93	Yes	**	0.0051	B-C
Test details	Mean rank 1	Mean rank 2	Mean rank diff.	n1	n2
Control vs. Vector	6.429	8.571	-2.143	7	7
Control vs. Vacunados	6.429	19.5	-13.07	7	10
Vector vs. Vacunados	8.571	19.5	-10.93	7	10

8.1.1.3.4 Día 42

Kruskal-Wallis test	
P value	0.0002
Exact or approximate P value?	Approximate
P value summary	***
Do the medians vary signif. (P < 0.05)?	Yes
Number of groups	3
Kruskal-Wallis statistic	17.27
Data summary	
Number of treatments (columns)	3
Number of values (total)	24

Dunn's multiple comparisons test	Mean rank diff.	Significant?	Summary	Adjusted P Value	
Control vs. Vector	-2.571	No	ns	>0.9999	A-B
Control vs. Vacunados	-13.29	Yes	***	0.0004	A-C
Vector vs. Vacunados	-10.71	Yes	**	0.0063	B-C
Test details	Mean rank 1	Mean rank 2	Mean rank diff.	n1	n2
Control vs. Vector	6.214	8.786	-2.571	7	7

Control vs. Vacunados	6.214	19.5	-13.29	7	10
Vector vs. Vacunados	8.786	19.5	-10.71	7	10

8.1.1.4 IgG2b

8.1.1.4.1 Día 0

Kruskal-Wallis test	
P value	0.5024
Exact or approximate P value?	Approximate
P value summary	ns
Do the medians vary signif. (P < 0.05)?	No
Number of groups	3
Kruskal-Wallis statistic	1.377
Data summary	
Number of treatments (columns)	3
Number of values (total)	24

Dunn's multiple comparisons test	Mean rank diff.	Significant?	Summary	Adjusted P Value	
Control vs. Vector	4.429	No	ns	0.7237	A-B
Control vs. Vacunados	2.386	No	ns	>0.9999	A-C
Vector vs. Vacunados	-2.043	No	ns	>0.9999	B-C
Test details	Mean rank 1	Mean rank 2	Mean rank diff.	n1	n2
Control vs. Vector	14.79	10.36	4.429	7	7
Control vs. Vacunados	14.79	12.4	2.386	7	10
Vector vs. Vacunados	10.36	12.4	-2.043	7	10

8.1.1.4.2 Día 14

Kruskal-Wallis test	
P value	0.0002
Exact or approximate P value?	Approximate
P value summary	***
Do the medians vary signif. (P < 0.05)?	Yes
Number of groups	3
Kruskal-Wallis statistic	16.81
Data summary	
Number of treatments (columns)	3
Number of values (total)	24

Dunn's multiple comparisons test	Mean rank diff.	Significant?	Summary	Adjusted P Value	
Control vs. Vector	0.4286	No	ns	>0.9999	A-B
Control vs. Vacunados	-11.79	Yes	**	0.0022	A-C
Vector vs. Vacunados	-12.21	Yes	**	0.0014	B-C
Test details	Mean rank 1	Mean rank 2	Mean rank diff.	n1	n2
Control vs. Vector	7.714	7.286	0.4286	7	7

Control vs. Vacunados	7.714	19.5	-11.79	7	10
Vector vs. Vacunados	7.286	19.5	-12.21	7	10

8.1.1.4.3 Día 28

Kruskal-Wallis test	
P value	0.0002
Exact or approximate P value?	Approximate
P value summary	***
Do the medians vary signif. (P < 0.05)?	Yes
Number of groups	3
Kruskal-Wallis statistic	17.04
Data summary	
Number of treatments (columns)	3
Number of values (total)	24

Dunn's multiple comparisons test	Mean rank diff.	Significant?	Summary	Adjusted P Value	
Control vs. Vector	-1.857	No	ns	>0.9999	A-B
Control vs. Vacunados	-12.93	Yes	***	0.0006	A-C
Vector vs. Vacunados	-11.07	Yes	**	0.0045	B-C
Test details	Mean rank 1	Mean rank 2	Mean rank diff.	n1	n2
Control vs. Vector	6.571	8.429	-1.857	7	7
Control vs. Vacunados	6.571	19.5	-12.93	7	10
Vector vs. Vacunados	8.429	19.5	-11.07	7	10

8.1.1.4.4 Día 42

Kruskal-Wallis test	
P value	0.0002
Exact or approximate P value?	Approximate
P value summary	***
Do the medians vary signif. (P < 0.05)?	Yes
Number of groups	3
Kruskal-Wallis statistic	17.56
Data summary	
Number of treatments (columns)	3
Number of values (total)	24

Dunn's multiple comparisons test	Mean rank diff.	Significant?	Summary	Adjusted P Value	
Control vs. Vector	-3.286	No	ns	>0.9999	A-B
Control vs. Vacunados	-13.64	Yes	***	0.0003	A-C
Vector vs. Vacunados	-10.36	Yes	**	0.0089	B-C
Test details	Mean rank 1	Mean rank 2	Mean rank diff.	n1	n2
Control vs. Vector	5.857	9.143	-3.286	7	7
Control vs. Vacunados	5.857	19.5	-13.64	7	10
Vector vs. Vacunados	9.143	19.5	-10.36	7	10

8.1.1.5 IgA

8.1.1.5.1 Día 0

Kruskal-Wallis test	
P value	0.7647
Exact or approximate P value?	Exact
P value summary	ns
Do the medians vary signif. (P < 0.05)?	No
Number of groups	3
Kruskal-Wallis statistic	0.6788
Data summary	
Number of treatments (columns)	3
Number of values (total)	11

Dunn's multiple comparisons test	Mean rank diff.	Significant?	Summary	Adjusted P Value	
Control vs. Vector	2	No	ns	>0.9999	A-B
Control vs. Vacunados	1.733	No	ns	>0.9999	A-C
Vector vs. Vacunados	-0.2667	No	ns	>0.9999	B-C
Test details	Mean rank 1	Mean rank 2	Mean rank diff.	n1	n2
Control vs. Vector	7.333	5.333	2	3	3
Control vs. Vacunados	7.333	5.6	1.733	3	5
Vector vs. Vacunados	5.333	5.6	-0.2667	3	5

8.1.1.5.2 Día 14

Kruskal-Wallis test	
P value	0.0028
Exact or approximate P value?	Exact
P value summary	**
Do the medians vary signif. (P < 0.05)?	Yes
Number of groups	3
Kruskal-Wallis statistic	7.879
Data summary	
Number of treatments (columns)	3
Number of values (total)	11

Dunn's multiple comparisons test	Mean rank diff.	Significant?	Summary	Adjusted P Value	
Control vs. Vector	-1.667	No	ns	>0.9999	A-B
Control vs. Vacunados	-6.333	Yes	*	0.0268	A-C
Vector vs. Vacunados	-4.667	No	ns	0.1621	B-C
Test details	Mean rank 1	Mean rank 2	Mean rank diff.	n1	n2
Control vs. Vector	2.667	4.333	-1.667	3	3
Control vs. Vacunados	2.667	9	-6.333	3	5
Vector vs. Vacunados	4.333	9	-4.667	3	5

8.1.1.5.3 Día 28

Kruskal-Wallis test	
P value	0.0054
Exact or approximate P value?	Exact
P value summary	**
Do the medians vary signif. (P < 0.05)?	Yes
Number of groups	3
Kruskal-Wallis statistic	7.515
Data summary	
Number of treatments (columns)	3
Number of values (total)	11

Dunn's multiple comparisons test	Mean rank diff.	Significant?	Summary	Adjusted P Value	
Control vs. Vector	0.3333	No	ns	>0.9999	A-B
Control vs. Vacunados	-5.333	No	ns	0.0830	A-C
Vector vs. Vacunados	-5.667	No	ns	0.0579	B-C
Test details	Mean rank 1	Mean rank 2	Mean rank diff.	n1	n2
Control vs. Vector	3.667	3.333	0.3333	3	3
Control vs. Vacunados	3.667	9	-5.333	3	5
Vector vs. Vacunados	3.333	9	-5.667	3	5

8.1.1.5.4 Día 42

Kruskal-Wallis test	
P value	0.0006
Exact or approximate P value?	Exact
P value summary	***
Do the medians vary signif. (P < 0.05)?	Yes
Number of groups	3
Kruskal-Wallis statistic	8.727
Data summary	
Number of treatments (columns)	3
Number of values (total)	11

Dunn's multiple comparisons test	Mean rank diff.	Significant?	Summary	Adjusted P Value	
Control vs. Vector	-3	No	ns	0.8038	A-B
Control vs. Vacunados	-7	Yes	*	0.0116	A-C
Vector vs. Vacunados	-4	No	ns	0.2959	B-C
Test details	Mean rank 1	Mean rank 2	Mean rank diff.	n1	n2
Control vs. Vector	2	5	-3	3	3
Control vs. Vacunados	2	9	-7	3	5
Vector vs. Vacunados	5	9	-4	3	5

8.1.2. Carga bacteriana fecal UFC/g

TEST DE NORMALIDAD

Test for normal distribution			
Anderson-Darling test			
A2*	0.3591	0.3791	1.032
P value	0.4217	0.3775	0.0091
Passed normality test (alpha=0.05)?	Yes	Yes	No
P value summary	ns	ns	**
D'Agostino & Pearson test			
K2	1.103	1.753	1.542
P value	0.5761	0.4163	0.4626
Passed normality test (alpha=0.05)?	Yes	Yes	Yes
P value summary	ns	ns	ns
Shapiro-Wilk test			
W	0.9535	0.9462	0.9287
P value	0.3225	0.2236	0.0146
Passed normality test (alpha=0.05)?	Yes	Yes	No
P value summary	ns	ns	*
Kolmogorov-Smirnov test			
KS distance	0.1186	0.1140	0.1480
P value	>0.1000	>0.1000	0.0275
Passed normality test (alpha=0.05)?	Yes	Yes	No
P value summary	ns	ns	*
Number of values	24	24	40

DIA 2

Table Analyzed	UFC 200 día 2
Kruskal-Wallis test	
P value	0.8466
Exact or approximate P value?	Exact
P value summary	ns
Do the medians vary signif. (P < 0.05)?	No
Number of groups	3
Kruskal-Wallis statistic	0.3584
Data summary	
Number of treatments (columns)	3
Number of values (total)	22

Number of families	1					
Number of comparisons per family	3					
Alpha	0.05					
Dunn's multiple comparisons test	Mean rank diff.	Significant?	Summary	Adjusted P Value		
Control vs. Vector	1.667	No	ns	>0.9999	A-B	
Control vs. Vacunados	-0.2667	No	ns	>0.9999	A-C	
Vector vs. Vacunados	-1.933	No	ns	>0.9999	B-C	
Test details	Mean rank 1	Mean rank 2	Mean rank diff.	n1	n2	Z

Control vs. Vector	11.83	10.17	1.667	6	6	0.4472
Control vs. Vacunados	11.83	12.10	-0.2667	6	10	0.08000
Vector vs. Vacunados	10.17	12.10	-1.933	6	10	0.5800

DIA 4

Table Analyzed	UFC 200 día 4
Kruskal-Wallis test	
P value	0.0002
Exact or approximate P value?	Exact
P value summary	***
Do the medians vary signif. (P < 0.05)?	Yes
Number of groups	3
Kruskal-Wallis statistic	12.78
Data summary	
Number of treatments (columns)	3
Number of values (total)	22

Number of families	1					
Number of comparisons per family	3					
Alpha	0.05					
Dunn's multiple comparisons test	Mean rank diff.	Significant?	Summary	Adjusted P Value		
Control vs. Vector	1.000	No	ns	>0.9999	A-B	
Control vs. Vacunados	10.40	Yes	**	0.0057	A-C	
Vector vs. Vacunados	9.400	Yes	*	0.0150	B-C	
Test details	Mean rank 1	Mean rank 2	Mean rank diff.	n1	n2	Z
Control vs. Vector	16.50	15.50	1.000	6	6	0.2670
Control vs. Vacunados	16.50	6.100	10.40	6	10	3.105
Vector vs. Vacunados	15.50	6.100	9.400	6	10	2.806

DIA 6

Table Analyzed	UFC 200 día 6
Kruskal-Wallis test	
P value	<0.0001
Exact or approximate P value?	Exact
P value summary	****
Do the medians vary signif. (P < 0.05)?	Yes
Number of groups	3
Kruskal-Wallis statistic	15.69
Data summary	
Number of treatments (columns)	3
Number of values (total)	22

Number of families	1					
Number of comparisons per family	3					
Alpha	0.05					
Dunn's multiple comparisons test	Mean rank diff.	Significant?	Summary	Adjusted P Value		
Control vs. Vector	-0.5000	No	ns	>0.9999	A-B	
Control vs. Vacunados	10.75	Yes	**	0.0040	A-C	
Vector vs. Vacunados	11.25	Yes	**	0.0024	B-C	

Test details	Mean rank 1	Mean rank 2	Mean rank diff.	n1	n2	Z
Control vs. Vector	16.25	16.75	-0.5000	6	6	0.1334
Control vs. Vacunados	16.25	5.500	10.75	6	10	3.208
Vector vs. Vacunados	16.75	5.500	11.25	6	10	3.357

Dia 8

Table Analyzed	UFC 200 día 8
Kruskal-Wallis test	
P value	0.4246
Exact or approximate P value?	Exact
P value summary	ns
Do the medians vary signif. (P < 0.05)?	No
Number of groups	3
Kruskal-Wallis statistic	1.783
Data summary	
Number of treatments (columns)	3
Number of values (total)	22

Number of families	1					
Number of comparisons per family	3					
Alpha	0.05					
Dunn's multiple comparisons test	Mean rank diff.	Significant?	Summary	Adjusted P Value		
Control vs. Vector	3.333	No	ns	>0.9999	A-B	
Control vs. Vacunados	-1.083	No	ns	>0.9999	A-C	
Vector vs. Vacunados	-4.417	No	ns	0.5581	B-C	
Test details	Mean rank 1	Mean rank 2	Mean rank diff.	n1	n2	Z
Control vs. Vector	11.92	8.583	3.333	6	6	0.8926
Control vs. Vacunados	11.92	13.00	-1.083	6	10	0.3244
Vector vs. Vacunados	8.583	13.00	-4.417	6	10	1.322

8.1.3 Variación de Peso

PRUEBA DE T

Table Analyzed	Variacion del Peso
Column B	Control
vs.	vs.
Column A	Vacunados
Paired t test	
P value	0.0257
P value summary	*
Significantly different (P < 0.05)?	Yes
One- or two-tailed P value?	Two-tailed
t, df	t=2.823, df=7
Number of pairs	8

How big is the difference?	
Mean of differences (B - A)	-4.776
SD of differences	4.786
SEM of differences	1.692
95% confidence interval	-8.778 to -0.7752
R squared (partial eta squared)	0.5323
How effective was the pairing?	
Correlation coefficient (r)	-0.007128
P value (one tailed)	0.4933
P value summary	ns
Was the pairing significantly effective?	No

Día 01

Table Analyzed	Dia 01
Column B	Control
vs.	vs.
Column A	Vacunados
Unpaired t test	
P value	0.0104
P value summary	*
Significantly different (P < 0.05)?	Yes
One- or two-tailed P value?	Two-tailed
t, df	t=2.880, df=17
How big is the difference?	
Mean of column A	104.2
Mean of column B	100.1
Difference between means (B - A) \pm SEM	-4.099 \pm 1.423
95% confidence interval	-7.101 to -1.096
R squared (eta squared)	0.3280
F test to compare variances	
F, DFn, Dfd	1.381, 9, 8
P value	0.6595
P value summary	ns
Significantly different (P < 0.05)?	No
Data analyzed	
Sample size, column A	9
Sample size, column B	10

Día 02

Table Analyzed	Dia 02
Column B	Control
vs.	vs.
Column A	Vacunados
Unpaired t test	
P value	0.0017
P value summary	**
Significantly different (P < 0.05)?	Yes
One- or two-tailed P value?	Two-tailed
t, df	t=3.730, df=17

How big is the difference?	
Mean of column A	107.7
Mean of column B	97.91
Difference between means (B - A) \pm SEM	-9.746 \pm 2.613
95% confidence interval	-15.26 to -4.233
R squared (eta squared)	0.4501
F test to compare variances	
F, DFn, Dfd	3.090, 9, 8
P value	0.1268
P value summary	ns
Significantly different (P < 0.05)?	No
Data analyzed	
Sample size, column A	9
Sample size, column B	10

Día 03

Table Analyzed	Dia 03
Column B	Control
vs.	vs.
Column A	Vacunados
Unpaired t test	
P value	0.0019
P value summary	**
Significantly different (P < 0.05)?	Yes
One- or two-tailed P value?	Two-tailed
t, df	t=3.675, df=17
How big is the difference?	
Mean of column A	111.0
Mean of column B	100.5
Difference between means (B - A) \pm SEM	-10.52 \pm 2.861
95% confidence interval	-16.55 to -4.480
R squared (eta squared)	0.4428
F test to compare variances	
F, DFn, Dfd	3.978, 9, 8
P value	0.0647
P value summary	ns
Significantly different (P < 0.05)?	No
Data analyzed	
Sample size, column A	9
Sample size, column B	10

Día 04

Table Analyzed	Dia 04
Column B	Control
vs.	vs.
Column A	Vacunados
Unpaired t test	

P value	0.0028
P value summary	**
Significantly different (P < 0.05)?	Yes
One- or two-tailed P value?	Two-tailed
t, df	t=3.492, df=17
How big is the difference?	
Mean of column A	112.2
Mean of column B	101.8
Difference between means (B - A) \pm SEM	-10.46 \pm 2.996
95% confidence interval	-16.79 to -4.143
R squared (eta squared)	0.4177
F test to compare variances	
F, DFn, Dfd	4.182, 9, 8
P value	0.0562
P value summary	ns
Significantly different (P < 0.05)?	No
Data analyzed	
Sample size, column A	9
Sample size, column B	10

Día 05

Table Analyzed	Dia 05
Column B	Control
vs.	vs.
Column A	Vacunados
Unpaired t test	
P value	0.3831
P value summary	ns
Significantly different (P < 0.05)?	No
One- or two-tailed P value?	Two-tailed
t, df	t=0.8954, df=17
How big is the difference?	
Mean of column A	106.8
Mean of column B	103.6
Difference between means (B - A) \pm SEM	-3.188 \pm 3.560
95% confidence interval	-10.70 to 4.324
R squared (eta squared)	0.04503
F test to compare variances	
F, DFn, Dfd	1.490, 9, 8
P value	0.5851
P value summary	ns
Significantly different (P < 0.05)?	No
Data analyzed	
Sample size, column A	9
Sample size, column B	10

Día 06

Table Analyzed	Dia 06
Column B	Control
vs.	vs.
Column A	Vacunados
Unpaired t test	
P value	0.8532
P value summary	ns
Significantly different (P < 0.05)?	No
One- or two-tailed P value?	Two-tailed
t, df	t=0.1878, df=17
How big is the difference?	
Mean of column A	106.0
Mean of column B	105.2
Difference between means (B - A) \pm SEM	-0.7256 \pm 3.863
95% confidence interval	-8.875 to 7.424
R squared (eta squared)	0.002071
F test to compare variances	
F, DFn, Dfd	1.966, 9, 8
P value	0.3540
P value summary	ns
Significantly different (P < 0.05)?	No
Data analyzed	
Sample size, column A	9
Sample size, column B	10

Día 07

Table Analyzed	Dia 07
Column B	Control
vs.	vs.
Column A	Vacunados
Unpaired t test	
P value	0.8998
P value summary	ns
Significantly different (P < 0.05)?	No
One- or two-tailed P value?	Two-tailed
t, df	t=0.1278, df=17
How big is the difference?	
Mean of column A	102.0
Mean of column B	102.6
Difference between means (B - A) \pm SEM	0.5278 \pm 4.131
95% confidence interval	-8.188 to 9.244
R squared (eta squared)	0.0009592
F test to compare variances	
F, DFn, Dfd	2.148, 9, 8
P value	0.2953
P value summary	ns
Significantly different (P < 0.05)?	No
Data analyzed	
Sample size, column A	9
Sample size, column B	10

8.3. RESULTADOS DE LAS EVALUACIONES

8.3.1 EVALUACION DE CITOQUINAS

GADPH

		Muestra	Ct GADPH	Ct Prom	Ct GAPDH	Ct Prom	2 ^Δ Delta	Promedio
CALIBRADOR	0	1a	24.38	24.00	24.38	24.00		
	0	1b	23.92		23.92			
	0	2a	23.57		23.57			
	0	2b	24.44		24.44			
	0	3a	23.75		23.75			
	0	3b	23.94		23.94			
ALPACA 1	1	Control 1	25.72	25.795	25.72	25.8	1.00	1.00
	1	Control 2	25.87		25.87		1.00	
	2	a1	25.95	26.145	25.95	26.1	1.00	1.00
	2	a2	26.34		26.34		1.00	
	3	b1	26.3	26.475	26.3	26.5	1.00	1.00
	3	b2	26.65		26.65		1.00	
	4	c1	26.92	26.905	26.92	26.9	1.00	1.00
	4	c2	26.89		26.89		1.00	
ALPACA 2	1	Control 1	26.21	26.345	26.21	26.3	1.00	1.00
	1	Control 2	26.48		26.48		1.00	
	2	a1	25.28	25.340	25.28	25.3	1.00	1.00
	2	a2	25.4		25.4		1.00	
	3	b1	27.29	27.435	27.29	27.4	1.00	1.00
	3	b2	27.58		27.58		1.00	
	4	c1	25.68	25.680	25.68	25.7	1.00	1.00
	4	c2	25.68		25.68		1.00	
ALPACA 3	1	Control 1	24.56	24.785	24.56	24.8	1.00	1.00
	1	Control 2	25.01		25.01		1.00	
	2	a1	24.86	25.470	24.86	25.5	1.00	1.00
	2	a2	26.08		26.08		1.00	
	3	b1	26.32	26.330	26.32	26.3	1.00	1.00
	3	b2	26.34		26.34		1.00	
	4	c1	26.4	26.570	26.4	26.6	1.00	1.00
	4	c2	26.74		26.74		1.00	
ALPACA 1	1	Control 1	25.19	26.320	25.19	26.3	1.00	1.00
	1	Control 2	27.45		27.45		1.00	
	2	a1	27.16	26.900	27.16	26.9	1.00	1.00
	2	a2	26.64		26.64		1.00	
	3	b1	28.18	27.900	28.18	27.9	1.00	1.00
	3	b2	27.62		27.62		1.00	

	4	c1	27.33	27.250	27.33	27.3	1.00	1.00
	4	c2	27.17		27.17		1.00	
ALPACA 2	1	Control 1	25.46	25.535	25.46	25.5	1.00	1.00
	1	Control 2	25.61		25.61		1.00	
	2	a1	25.84	26.000	25.84	26.0	1.00	1.00
	2	a2	26.16		26.16		1.00	
	3	b1	26.72	26.695	26.72	26.7	1.00	1.00
	3	b2	26.67		26.67		1.00	
	4	c1	26.15	26.285	26.15	26.3	1.00	1.00
	4	c2	26.42		26.42		1.00	
ALPACA 3	1	Control 1	24.88	25.015	24.88	25.0	1.00	1.00
	1	Control 2	25.15		25.15		1.00	
	2	a1	26.09	26.070	26.09	26.1	1.00	1.00
	2	a2	26.05		26.05		1.00	
	3	b1	27.64	26.280	27.64	26.3	1.00	1.00
	3	b2	24.92		24.92		1.00	
	4	c1	27.17	26.845	27.17	26.8	1.00	1.00
	4	c2	26.52		26.52		1.00	

INF-γ

			Muestra	Ct INF	Ct Prom	Ct GAPDH	Ct Prom	2 ^Δ Delt a	Promedi o
	CALIBRADO R	0	1a	25.61	26.05	24.38	24.00		
		0	1b	26.04		23.92			
		0	2a	26.54		23.57			
		0	2b	25.83		24.44			
		0	3a	26.07		23.75			
		0	3b	26.22		23.94			
48 HORAS	ALPACA 1	1	Control 1	27.05	26.940	25.72	25.8	1.65	1.89
		1	Control 2	26.83		25.87		2.13	
		2	a1	27.17	26.980	25.95	26.1	1.78	2.41
		2	a2	26.79		26.34		3.03	
		3	b1	26.89	26.630	26.3	26.5	2.75	3.89
		3	b2	26.37		26.65		5.03	
		4	c1	27.82	27.820	26.92	26.9	2.22	2.20
		4	c2	27.82		26.89		2.18	
	ALPACA 2	1	Control 1	26.68	26.715	26.21	26.3	2.99	3.22
		1	Control 2	26.75		26.48		3.44	
		2	a1	26.38	26.255	25.28	25.3	1.93	2.22
		2	a2	26.13		25.4		2.50	
		3	b1	26.99	28.605	27.29	27.4	5.10	2.88

		3	b2	30.22		27.58		0.67	
		4	c1	26.62	26.470	25.68	25.7	2.16	2.41
		4	c2	26.32		25.68		2.66	
	ALPACA 3	1	Control 1	26.71	26.545	24.56	24.8	0.93	1.27
		1	Control 2	26.38		25.01		1.60	
		2	a1	25.77	25.950	24.86	25.5	2.21	3.11
		2	a2	26.13		26.08		4.00	
		3	b1	26.31	26.120	26.32	26.3	4.17	4.84
		3	b2	25.93		26.34		5.51	
		4	c1	26.3	26.240	26.4	26.6	4.44	5.28
		4	c2	26.18		26.74		6.11	
72 HORAS	ALPACA 1	1	Control 1	26.82	26.975	25.19	26.3	1.34	3.26
		1	Control 2	27.13		27.45		5.18	
		2	a1	27.13	26.765	27.16	26.9	4.23	4.56
		2	a2	26.4		26.64		4.90	
		3	b1	27.98	27.750	28.18	27.9	4.76	4.60
		3	b2	27.52		27.62		4.44	
		4	c1	27.4	27.265	27.33	27.3	3.95	4.11
		4	c2	27.13		27.17		4.26	
	ALPACA 2	1	Control 1	26.34	26.140	25.46	25.5	2.25	2.78
		1	Control 2	25.94		25.61		3.30	
		2	a1	27.07	27.150	25.84	26.0	1.77	1.87
		2	a2	27.23		26.16		1.97	
		3	b1	27.34	26.920	26.72	26.7	2.70	3.68
		3	b2	26.5		26.67		4.66	
		4	c1	26.82	26.735	26.15	26.3	2.61	3.07
		4	c2	26.65		26.42		3.53	
	ALPACA 3	1	Control 1	26.63	26.510	24.88	25.0	1.23	1.49
		1	Control 2	26.39		25.15		1.76	
		2	a1	26.52	26.730	26.09	26.1	3.08	2.66
		2	a2	26.94		26.05		2.24	
		3	b1	26.15	26.150	27.64	26.3	11.65	6.71
		3	b2	26.15		24.92		1.77	
		4	c1	26.94	26.545	27.17	26.8	4.86	5.11
		4	c2	26.15		26.52		5.36	

			Muestra	Ct IL-2	Ct Prom	Ct GAPDH	Ct Prom	2 ^Δ Delta	Promedio
	CALIBRADOR	0	1a	30.13	30.34	24.38	24.00		
		0	1b	32.02		23.92			
		0	2a	30.16		23.57			
		0	2b	30.07		24.44			
		0	3a	29.77		23.75			
		0	3b	29.88		23.94			
48 HORAS	ALPACA 1	1	Control 1	31.2	31.065	25.72	25.8	1.81	2.12
		1	Control 2	30.93		25.87		2.43	
		2	a1	31.43	31.310	25.95	26.1	1.81	2.31
		2	a2	31.19		26.34		2.81	
		3	b1	30.82	30.935	26.3	26.5	3.53	3.68
		3	b2	31.05		26.65		3.83	
		4	c1	31.67	31.530	26.92	26.9	3.01	3.29
		4	c2	31.39		26.89		3.58	
	ALPACA 2	1	Control 1	31.29	31.380	26.21	26.3	2.39	2.47
		1	Control 2	31.47		26.48		2.55	
		2	a1	30.19	30.295	25.28	25.3	2.69	2.61
		2	a2	30.4		25.4		2.53	
		3	b1	31.17	30.895	27.29	27.4	5.50	7.67
		3	b2	30.62		27.58		9.84	
		4	c1	31.26	30.860	25.68	25.7	1.69	2.32
		4	c2	30.46		25.68		2.95	
	ALPACA 3	1	Control 1	30.21	30.385	24.56	24.8	1.61	1.67
		1	Control 2	30.56		25.01		1.73	
		2	a1	29.42	29.490	24.86	25.5	3.43	5.34
		2	a2	29.56		26.08		7.25	
		3	b1	29.63	29.620	26.32	26.3	8.16	8.27
		3	b2	29.61		26.34		8.39	
		4	c1	30.38	30.450	26.4	26.6	5.13	5.51
		4	c2	30.52		26.74		5.89	
72 HORAS	ALPACA 1	1	Control 1	31.59	31.555	25.19	26.3	0.96	2.89
		1	Control 2	31.52		27.45		4.82	
		2	a1	31.27	31.090	27.16	26.9	4.69	4.44
		2	a2	30.91		26.64		4.19	
		3	b1	32.51	32.430	28.18	27.9	4.02	3.54
		3	b2	32.35		27.62		3.05	
		4	c1	32.01	31.955	27.33	27.3	3.16	3.10

		4	c2	31.9		27.17		3.05	
	ALPACA 2	1	Control 1	31.03	31.075	25.46	25.5	1.70	1.74
		1	Control 2	31.12		25.61		1.78	
		2	a1	31.23	31.370	25.84	26.0	1.93	1.96
		2	a2	31.51		26.16		1.98	
		3	b1	31.14	31.205	26.72	26.7	3.78	3.56
		3	b2	31.27		26.67		3.34	
		4	c1	31.72	31.960	26.15	26.3	1.70	1.59
		4	c2	32.2		26.42		1.47	
	ALPACA 3	1	Control 1	30.96	30.830	24.88	25.0	1.20	1.46
		1	Control 2	30.7		25.15		1.73	
		2	a1	30.63	30.880	26.09	26.1	3.48	2.94
		2	a2	31.13		26.05		2.39	
		3	b1	30.03	30.055	27.64	26.3	15.44	8.85
		3	b2	30.08		24.92		2.26	
		4	c1	30.33	30.440	27.17	26.8	9.05	7.00
		4	c2	30.55		26.52		4.95	

IL-4

			Muestra	Ct IL-4	Ct Prom	Ct GAPDH	Ct Prom	2 ^Δ Delta	Promedio
	CALIBRADOR	0	1a	31.39	31.76	24.38	24.00		
		0	1b	30.85		23.92			
		0	2a	31.97		23.57			
		0	2b	31.96		24.44			
		0	3a	32.13		23.75			
		0	3b	32.25		23.94			
48 HORAS	ALPACA 1	1	Control 1	32.69	32.480	25.72	25.8	1.73	2.15
		1	Control 2	32.27		25.87		2.56	
		2	a1	32.52	32.845	25.95	26.1	2.28	2.09
		2	a2	33.17		26.34		1.90	
		3	b1	32.5	32.480	26.3	26.5	2.95	3.40
		3	b2	32.46		26.65		3.86	
		4	c1	32.72	32.725	26.92	26.9	3.89	3.83
		4	c2	32.73		26.89		3.78	
	ALPACA 2	1	Control 1	32.08	32.150	26.21	26.3	3.70	3.88
		1	Control	32.22		26.48		4.05	

			2						
		2	a1	31.51	31.595	25.28	25.3	2.88	2.84
		2	a2	31.68		25.4		2.79	
		3	b1	32.23	32.385	27.29	27.4	7.05	7.00
		3	b2	32.54		27.58		6.96	
		4	c1	31.13	31.125	25.68	25.7	4.95	4.97
		4	c2	31.12		25.68		4.99	
	ALPACA 3	1	Control 1	31.09	31.265	24.56	24.8	2.34	2.43
		1	Control 2	31.44		25.01		2.51	
		2	a1	31.3	31.685	24.86	25.5	2.49	2.95
		2	a2	32.07		26.08		3.41	
		3	b1	31.28	31.400	26.32	26.3	6.96	6.46
		3	b2	31.52		26.34		5.97	
		4	c1	31.79	31.950	26.4	26.6	5.16	5.20
		4	c2	32.11		26.74		5.24	
72 HORAS	ALPACA 1	1	Control 1	32.78	32.535	25.19	26.3	1.12	4.34
		1	Control 2	32.29		27.45		7.56	
		2	a1	31.69	31.610	27.16	26.9	9.37	8.34
		2	a2	31.53		26.64		7.30	
		3	b1	32.76	32.780	28.18	27.9	9.05	7.51
		3	b2	32.8		27.62		5.97	
		4	c1	32.39	32.245	27.33	27.3	6.49	6.80
		4	c2	32.1		27.17		7.10	
	ALPACA 2	1	Control 1	31.72	31.645	25.46	25.5	2.83	3.15
		1	Control 2	31.57		25.61		3.48	
		2	a1	32.55	32.385	25.84	26.0	2.07	2.66
		2	a2	32.22		26.16		3.25	
		3	b1	31.96	31.805	26.72	26.7	5.73	6.29
		3	b2	31.65		26.67		6.86	
		4	c1	32.31	32.215	26.15	26.3	3.03	3.60
		4	c2	32.12		26.42		4.17	
	ALPACA 3	1	Control 1	32.56	32.415	24.88	25.0	1.06	1.31
		1	Control 2	32.27		25.15		1.56	
		2	a1	32.15	32.080	26.09	26.1	3.25	3.36
		2	a2	32.01		26.05		3.48	
		3	b1	34.24	33.740	27.64	26.3	2.23	1.45
		3	b2	33.24		24.92		0.68	
		4	c1	32.15	32.405	27.17	26.8	6.86	4.97

		4	c2	32.66		26.52		3.07	
--	--	---	----	-------	--	-------	--	------	--

IL-10

			Muestra	Ct IL-10	Ct Prom	Ct GAPDH	Ct Prom	2 ^Δ Delta	Promedio
	CALIBRADOR	0	1a	36.13	34.41	24.38	24.00		
		0	1b	34.66		23.92			
		0	2a	33.7		23.57			
		0	2b	34.1		24.44			
		0	3a	33.89		23.75			
		0	3b	34		23.94			
48 HORAS	ALPACA 1	1	Control 1	37.32	37.455	25.72	25.8	0.44	0.42
		1	Control 2	37.59		25.87		0.40	
		2	a1	38.62	37.325	25.95	26.1	0.21	0.93
		2	a2	36.03		26.34		1.65	
		3	b1	36.94	37.765	26.3	26.5	0.85	0.60
		3	b2	38.59		26.65		0.35	
		4	c1	35.81	36.705	26.92	26.9	2.87	1.84
		4	c2	37.6		26.89		0.81	
	ALPACA 2	1	Control 1	36.45	36.485	26.21	26.3	1.13	1.21
		1	Control 2	36.52		26.48		1.30	
		2	a1	35.39	35.520	25.28	25.3	1.23	1.18
		2	a2	35.65		25.4		1.12	
		3	b1	36.37	36.185	27.29	27.4	2.52	3.25
		3	b2	36		27.58		3.98	
		4	c1	34.19	33.785	25.68	25.7	3.74	5.15
		4	c2	33.38		25.68		6.56	
	ALPACA 3	1	Control 1	36.13	35.210	24.56	24.8	0.45	1.32
		1	Control 2	34.29		25.01		2.19	
		2	a1	35.67	34.785	24.86	25.5	0.76	3.40
		2	a2	33.9		26.08		6.03	
		3	b1	34.09	34.550	26.32	26.3	6.25	4.80
		3	b2	35.01		26.34		3.35	
		4	c1	36.46	35.430	26.4	26.6	1.28	4.01
		4	c2	34.4		26.74		6.74	
72 HORAS	ALPACA 1	1	Control 1	37.59	37.495	25.19	26.3	0.25	0.82
		1	Control 2	37.4		27.45		1.38	
		2	a1	35.02	35.445	27.16	26.9	5.87	4.07

		2	a2	35.87	37.700	26.64	27.9	2.27	1.56
		3	b1	37.7		28.18		1.86	
		3	b2	37.7		27.62		1.26	
		4	c1	34.47	35.115	27.33	27.3	9.67	6.60
		4	c2	35.76		27.17		3.54	
	ALPACA 2	1	Control 1	34.28	33.895	25.46	25.5	3.02	4.36
		1	Control 2	33.51		25.61		5.71	
		2	a1	34.3	34.295	25.84	26.0	3.87	4.37
		2	a2	34.29		26.16		4.87	
		3	b1	33.96	34.190	26.72	26.7	9.02	7.68
		3	b2	34.42		26.67		6.33	
		4	c1	35.65	35.895	26.15	26.3	1.88	1.75
		4	c2	36.14		26.42		1.62	
	ALPACA 3	1	Control 1	37.57	37.945	24.88	25.0	0.21	0.18
		1	Control 2	38.32		25.15		0.15	
		2	a1	35.42	35.540	26.09	26.1	2.12	1.93
		2	a2	35.66		26.05		1.75	
		3	b1	35.95	35.985	27.64	26.3	4.30	2.46
		3	b2	36.02		24.92		0.62	
		4	c1	34.45	37.140	27.17	26.8	8.77	4.45
		4	c2	39.83		26.52		0.13	

TNF- α

			Muestra	Ct IL-10	Ct Prom	Ct GAPDH	Ct Prom	2 ^Δ Delta	Promedio
	CALIBRADOR	0	1a	34.49	33.65	24.38	24.00		
		0	1b	32.79		23.92			
		0	2a			23.57			
		0	2b	33.25		24.44			
		0	3a	35.47		23.75			
		0	3b	32.26		23.94			
48 HORAS	ALPACA 1	1	Control 1	34.01	33.310	25.72	25.8	2.57	5.05
		1	Control 2	32.61		25.87		7.53	
		2	a1	33.58	35.065	25.95	26.1	4.06	2.37
		2	a2	36.55		26.34		0.68	
		3	b1	35.32	34.805	26.3	26.5	1.55	2.79
		3	b2	34.29		26.65		4.03	
		4	c1	34.17	35.390	26.92	26.9	5.29	3.12
		4	c2	36.61		26.89		0.95	

	ALPACA 2	1	Control 1	33.35	33.350	26.21	26.3	5.70	6.29
		1	Control 2	33.35		26.48		6.88	
		2	a1	36.17	36.170	25.28	25.3	0.42	0.44
		2	a2	36.17		25.4		0.46	
		3	b1	39.13	39.130	27.29	27.4	0.22	0.24
		3	b2	39.13		27.58		0.27	
		4	c1	36.56	36.540	25.68	25.7	0.43	0.43
		4	c2	36.52		25.68		0.44	
	ALPACA 3	1	Control 1	37.21	37.005	24.56	24.8	0.13	0.18
		1	Control 2	36.8		25.01		0.23	
		2	a1	34	34.000	24.86	25.5	1.43	2.37
		2	a2	34		26.08		3.32	
		3	b1	33.72	33.785	26.32	26.3	4.76	4.59
		3	b2	33.85		26.34		4.41	
		4	c1	33.86	33.860	26.4	26.6	4.57	5.18
		4	c2	33.86		26.74		5.78	
72 HORAS	ALPACA 1	1	Control 1	33.54	34.790	25.19	26.3	2.47	2.28
		1	Control 2	36.04		27.45		2.09	
		2	a1	37.49	36.520	27.16	26.9	0.63	1.15
		2	a2	35.55		26.64		1.67	
		3	b1	37.2	37.200	28.18	27.9	1.55	1.30
		3	b2	37.2		27.62		1.05	
		4	c1	38.69	36.860	27.33	27.3	0.31	1.88
		4	c2	35.03		27.17		3.46	
	ALPACA 2	1	Control 1	32.57	35.800	25.46	25.5	5.82	2.95
		1	Control 2	39.03		25.61		0.07	
		2	a1	37.32	35.805	25.84	26.0	0.28	1.58
		2	a2	34.29		26.16		2.87	
		3	b1	33.89	33.890	26.72	26.7	5.59	5.49
		3	b2	33.89		26.67		5.40	
		4	c1	35.54	34.845	26.15	26.3	1.20	2.49
		4	c2	34.15		26.42		3.79	
	ALPACA 3	1	Control 1	34.82	35.115	24.88	25.0	0.82	0.74
		1	Control 2	35.41		25.15		0.66	
		2	a1	34.01	35.550	26.09	26.1	3.32	1.85
		2	a2	37.09		26.05		0.38	
		3	b1	37.21	37.210	27.64	26.3	1.06	0.61

		3	b2	37.21		24.92		0.16	
		4	c1	35.02	35.020	27.17	26.8	3.49	2.85
		4	c2	35.02		26.52		2.22	

8.3.2 Medición de Anticuerpos

IgG

		Day 0			Day 14			Day 28			Day 42		
		A	B	DO (media)	A	B	DO (media)	A	B	DO (media)	A	B	DO (media)
1	Control	0.272	0.234	0.253	0.533	0.514	0.524	0.604	0.483	0.544	0.521	0.54	0.531
2		0.315	0.324	0.320	0.516	0.47	0.493	0.431	0.614	0.523	0.223	0.224	0.224
3		0.493	0.483	0.488	0.364	0.44	0.402	0.462	0.228	0.345	0.387	0.283	0.335
4		0.599	0.572	0.586	0.611	0.633	0.622	0.86	0.604	0.732	0.78	0.748	0.764
5		0.461	0.534	0.498	0.344	0.346	0.345	0.643	0.363	0.503	0.456	0.479	0.468
6		0.321	0.328	0.325	0.322	0.32	0.321	0.55	0.454	0.502	0.49	0.471	0.481
7		0.424	0.440	0.432	0.433	0.459	0.446	0.554	0.653	0.604	0.322	0.262	0.292
1	Vector	0.240	0.323	0.282	0.26	0.248	0.254	0.461	0.349	0.405	0.274	0.293	0.284
2		0.334	0.270	0.302	0.377	0.358	0.368	0.628	0.985	0.807	0.416	0.474	0.445
3		0.227	0.240	0.234	0.65	0.574	0.612	0.556	0.335	0.446	0.362	0.432	0.397
4		0.428	0.387	0.408	0.289	0.221	0.255	0.479	0.671	0.575	0.401	0.362	0.382
5		0.430	0.436	0.433	0.634	0.56	0.597	0.364	0.283	0.324	0.346	0.348	0.347
6		0.313	0.359	0.336	0.574	0.536	0.555	0.229	0.425	0.327	0.493	0.473	0.483
7		0.339	0.514	0.427	0.604	0.464	0.534	0.29	0.39	0.340	0.367	0.46	0.414
1	Anti-f17	0.334	0.373	0.354	1.522	1.427	1.475	1.304	1.106	1.205	1.14	1.149	1.145
2		0.291	0.230	0.261	0.864	0.807	0.836	0.763	1.543	1.153	1.136	1.128	1.132
3		0.311	0.334	0.323	0.92	0.963	0.942	1.164	1.141	1.153	1.848	1.88	1.864
4		0.254	0.270	0.262	2.271	2.238	2.255	2.527	2.427	2.477	1.057	1.094	1.076
5		0.962	1.002	0.982	1.064	0.942	1.003	1.234	1.232	1.233	1.403	1.383	1.393
6		0.694	0.674	0.684	1.489	1.441	1.465	1.082	1.043	1.063	1.099	1.077	1.088
7		0.466	0.523	0.495	0.923	0.982	0.953	1.133	1.094	1.114	1.214	1.17	1.192
8		0.370	0.336	0.353	0.831	0.813	0.822	2.456	2.411	2.434	1.227	1.278	1.253
9		0.540	0.526	0.533	1.114	1.074	1.094	1.324	1.302	1.313	1.025	1.044	1.035
10		0.492	0.419	0.456	1.463	1.38	1.422	1.188	1.165	1.177	1.195	1.136	1.166

IgG1

		Day 0			Day 14			Day 28			Day 42		
		A	B	Average	A	B	Average	A	B	Average	A	B	Average
1	Control	0.092	0.093	0.093	0.188	0.198	0.193	0.118	0.096	0.107	0.125	0.101	0.113
2		0.117	0.108	0.113	0.13	0.162	0.146	0.152	0.128	0.140	0.092	0.083	0.088
3		0.180	0.206	0.193	0.223	0.185	0.204	0.094	0.054	0.074	0.093	0.119	0.106
4		0.110	0.098	0.104	0.128	0.098	0.113	0.103	0.129	0.116	0.129	0.137	0.133
5		0.085	0.065	0.075	0.108	0.083	0.096	0.165	0.181	0.173	0.018	0.323	0.171
6		0.189	0.162	0.176	0.126	0.104	0.115	0.249	0.264	0.257	0.129	0.1	0.115
7		0.123	0.145	0.134	0.105	0.149	0.127	0.155	0.177	0.166	0.112	0.1	0.106
1	Vector	0.102	0.080	0.091	0.186	0.217	0.202	0.174	0.203	0.189	0.143	0.159	0.151
2		0.126	0.128	0.127	0.095	0.125	0.110	0.182	0.188	0.185	0.149	0.157	0.153
3		0.087	0.094	0.091	0.18	0.188	0.184	0.117	0.094	0.106	0.12	0.138	0.129
4		0.131	0.117	0.124	0.295	0.287	0.291	0.21	0.2	0.205	0.149	0.178	0.164
5		0.196	0.184	0.190	0.215	0.201	0.208	0.119	0.089	0.104	0.143	0.175	0.159
6		0.124	0.150	0.137	0.127	0.136	0.132	0.187	0.196	0.192	0.327	0.339	0.333
7		0.143	0.135	0.139	0.254	0.28	0.267	0.162	0.144	0.153	0.123	0.098	0.111
1	Anti-F17	0.222	0.235	0.229	0.221	0.179	0.200	0.335	0.314	0.325	0.346	0.328	0.337
2		0.099	0.070	0.085	0.326	0.305	0.316	0.408	0.428	0.418	0.378	0.384	0.381
3		0.173	0.151	0.162	0.215	0.253	0.234	0.217	0.249	0.233	0.329	0.367	0.348
4		0.088	0.069	0.079	0.751	0.721	0.736	0.619	0.594	0.607	0.625	0.657	0.641
5		0.096	0.098	0.097	0.261	0.247	0.254	0.342	0.356	0.349	0.539	0.553	0.546
6		0.101	0.125	0.113	0.244	0.221	0.233	0.251	0.227	0.239	0.245	0.268	0.257
7		0.063	0.047	0.055	0.271	0.253	0.262	0.295	0.322	0.309	0.474	0.487	0.481
8		0.166	0.144	0.155	0.225	0.267	0.246	0.253	0.263	0.258	0.352	0.342	0.347
9		0.117	0.087	0.102	0.551	0.469	0.510	0.47	0.501	0.486	0.428	0.438	0.433
10		0.152	0.210	0.181	0.223	0.208	0.216	0.439	0.421	0.430	0.565	0.558	0.562

IgG2A

		Day 0			Day 14			Day 28			Day 42		
		A	B	Average	A	B	Average	A	B	Average	A	B	Average
1	Control	0.182	0.208	0.195	0.401	0.413	0.407	0.092	0.102	0.097	0.126	0.146	0.136
2		0.132	0.128	0.130	0.13	0.238	0.184	0.272	0.247	0.260	0.232	0.262	0.247
3		0.279	0.285	0.282	0.375	0.411	0.393	0.091	0.077	0.084	0.191	0.184	0.188
4		0.602	0.477	0.540	0.187	0.194	0.191	0.375	0.358	0.367	0.277	0.299	0.288
5		0.201	0.153	0.177	0.255	0.277	0.266	0.201	0.209	0.205	0.17	0.174	0.172
6		0.138	0.128	0.133	0.179	0.159	0.169	0.142	0.158	0.150	0.465	0.453	0.459
7		0.229	0.205	0.217	0.19	0.204	0.197	0.33	0.337	0.334	0.152	0.131	0.142
1	Vector	0.204	0.187	0.196	0.182	0.185	0.184	0.346	0.366	0.356	0.22	0.226	0.223
2		0.197	0.177	0.187	0.27	0.268	0.269	0.241	0.223	0.232	0.379	0.413	0.396
3		0.179	0.197	0.188	0.375	0.395	0.385	0.26	0.25	0.255	0.331	0.323	0.327
4		0.155	0.181	0.168	0.126	0.114	0.120	0.228	0.199	0.214	0.239	0.226	0.233
5		0.200	0.209	0.205	0.225	0.19	0.208	0.206	0.226	0.216	0.227	0.202	0.215
6		0.283	0.277	0.280	0.251	0.241	0.246	0.207	0.199	0.203	0.193	0.182	0.188
7		0.229	0.243	0.236	0.266	0.245	0.256	0.378	0.391	0.385	0.315	0.293	0.304
1	Anti-F17	0.270	0.313	0.292	0.525	0.505	0.515	0.898	0.884	0.891	0.793	0.795	0.794
2		0.463	0.446	0.455	0.522	0.51	0.516	0.76	0.768	0.764	0.628	0.606	0.617
3		0.245	0.231	0.238	0.536	0.552	0.544	0.875	0.92	0.898	0.862	0.868	0.865
4		0.098	0.114	0.106	0.9	0.959	0.930	1.055	1.121	1.088	0.945	0.922	0.934
5		0.326	0.360	0.343	0.554	0.584	0.569	0.654	0.642	0.648	0.618	0.642	0.630
6		0.271	0.275	0.273	0.856	0.804	0.830	0.435	0.407	0.421	0.701	0.687	0.694
7		0.125	0.147	0.136	0.531	0.496	0.514	0.588	0.604	0.596	0.614	0.601	0.608
8		0.249	0.231	0.240	0.496	0.476	0.486	0.734	0.757	0.746	0.58	0.576	0.578
9		0.254	0.243	0.249	0.826	0.882	0.854	0.493	0.509	0.501	0.665	0.687	0.676
10		0.334	0.382	0.358	0.556	0.444	0.500	0.819	0.823	0.821	0.549	0.53	0.540

IgG2b

		Day 0			Day 14			Day 28			Day 42		
		A	B	Average	A	B	Average	A	B	Average	A	B	Average
1	Control	0.272	0.262	0.267	0.419	0.409	0.414	0.228	0.216	0.222	0.332	0.3	0.316
2		0.462	0.488	0.475	0.43	0.446	0.438	0.376	0.4	0.388	0.346	0.321	0.334
3		0.180	0.664	0.422	0.32	0.322	0.321	0.218	0.245	0.232	0.287	0.309	0.298
4		0.438	0.421	0.430	0.315	0.297	0.306	0.275	0.251	0.263	0.281	0.305	0.293
5		0.371	0.361	0.366	0.321	0.347	0.334	0.209	0.227	0.218	0.221	0.257	0.239
6		0.281	0.273	0.277	0.371	0.39	0.381	0.395	0.373	0.384	0.334	0.313	0.324
7		0.350	0.332	0.341	0.164	0.754	0.459	0.329	0.356	0.343	0.301	0.311	0.306
1	Vector	0.330	0.313	0.322	0.508	0.525	0.517	0.31	0.3	0.305	0.278	0.272	0.275
2		0.271	0.263	0.267	0.315	0.333	0.324	0.362	0.35	0.356	0.308	0.323	0.316
3		0.326	0.305	0.316	0.35	0.374	0.362	0.315	0.299	0.307	0.355	0.373	0.364
4		0.369	0.379	0.374	0.346	0.352	0.349	0.387	0.366	0.377	0.379	0.405	0.392
5		0.373	0.383	0.378	0.415	0.402	0.409	0.316	0.342	0.329	0.34	0.325	0.333
6		0.260	0.250	0.255	0.287	0.269	0.278	0.3016	0.324	0.313	0.35	0.38	0.365
7		0.261	0.266	0.264	0.374	0.402	0.388	0.339	0.377	0.358	0.319	0.311	0.315
1	Anti-f17	0.392	0.376	0.384	0.67	0.675	0.673	0.502	0.534	0.518	0.537	0.546	0.542
2		0.603	0.593	0.598	0.663	0.654	0.659	0.62	0.617	0.619	0.864	0.842	0.853
3		0.267	0.259	0.263	1.08	1.134	1.107	0.643	0.657	0.650	0.726	0.716	0.721
4		0.268	0.239	0.254	0.772	0.752	0.762	0.973	0.991	0.982	0.688	0.665	0.677
5		0.204	0.232	0.218	1.06	1.042	1.051	1.313	1.329	1.321	0.94	0.93	0.935
6		0.295	0.301	0.298	0.693	0.675	0.684	0.753	0.772	0.763	0.941	0.943	0.942
7		0.303	0.292	0.298	0.773	0.755	0.764	0.653	0.685	0.669	0.612	0.612	0.612
8		0.701	0.692	0.697	0.805	0.798	0.802	0.584	0.598	0.591	0.543	0.538	0.541
9		0.315	0.303	0.309	1.052	1.07	1.061	0.839	0.849	0.844	0.786	0.776	0.781
10		0.695	0.683	0.689	0.678	0.708	0.693	0.766	0.786	0.776	0.992	0.971	0.982

IgA

		Day 0			Day 14			Day 28			Day 42		
		A	B	Average	A	B	Average	A	B	Average	A	B	Average
1	Control	0.309	0.291	0.3	0.263	0.277	0.27	0.275	0.285	0.28	0.281	0.299	0.29
2		0.342	0.358	0.35	0.228	0.24	0.234	0.326	0.334	0.33	0.263	0.256	0.2595
3		0.34	0.319	0.3295	0.255	0.265	0.26	0.338	0.301	0.3195	0.234	0.246	0.24
1	Vector	0.356	0.324	0.34	0.25	0.229	0.2395	0.307	0.293	0.3	0.305	0.294	0.2995
2		0.234	0.246	0.24	0.333	0.302	0.3175	0.285	0.294	0.2895	0.327	0.313	0.32
3		0.261	0.278	0.2695	0.301	0.279	0.29	0.316	0.324	0.32	0.366	0.353	0.3595
1	Anti-F17	0.429	0.439	0.434	0.709	0.73	0.7195	0.859	0.865	0.862	1.082	0.912	0.997
2		0.261	0.238	0.2495	1.43	1.494	1.462	0.92	0.897	0.9085	1.215	1.197	1.206
3		0.435	0.421	0.428	1.366	1.334	1.35	0.623	0.609	0.616	1.24	1.213	1.2265
4		0.204	0.189	0.1965	0.886	0.871	0.8785	1.38	1.364	1.372	1.533	1.515	1.524
5		0.218	0.198	0.208	0.958	0.966	0.962	1.015	1.144	1.0795	1.088	1.013	1.0505

8.3.3

ELIMINACION FECAL

Muestra	LOG	UFC*50	UFC	CT
C1-48	3.37856647	2390.927843	47.8185569	28.19
c2-48	3.72785747	5343.889489	106.87779	27.23
C3-48	3.73149592	5388.847782	107.776956	27.22
V1-48	3.94252589	8760.439503	175.20879	26.64
V2-48	5.01586803	103721.3181	2074.42636	23.69
V3-48	3.72785747	5343.889489	106.87779	27.23
F1-48	3.60415024	4019.298302	80.385966	27.57
F2-48	5.68898089	488630.8574	9772.61715	21.84
F3-48	3.34945889	2235.933517	44.7186703	28.27
F4-48	3.36401268	2312.132285	46.2426457	28.23
F5-48	3.52774283	3370.876439	67.4175288	27.78
C1-T2	3.67857421	4770.613254	95.4122651	27.32
C2-T2	6.45722828	2865683.861	57313.6772	19.73
C3-T2	7.33985656	21870391.51	437407.83	17.03
V1-T2	7.48842142	30790831.64	615816.633	17
V2-T2	7.22391536	16746164.88	334923.298	17.56
V3-T2	3.49602639	3133.476108	62.6695222	27.56
F1-T2	4.93414509	85930.05589	1718.60112	23.48
F2-T2	6.08112171	1205373.683	24107.4737	20.18
F3-T2	3.82351214	6660.58143	133.211629	26.35
F4-T2	3.92432017	8400.790865	168.015817	26.25
F5-T2	5.08266828	120967.3809	2419.34762	22.99
C1-T4	3.72058057	5255.095014	105.1019	27.25
C2-T4	3.69147299	4914.428143	98.2885629	27.33
C3-T4	3.70966523	5124.662028	102.493241	27.28
V1-T4	3.62598093	4226.500523	84.5300105	27.51
V3-T4	3.56048886	3634.869847	72.6973969	27.69
F2-T4	3.73513436	5434.18431	108.683686	27.21
F3-T4	3.52410439	3342.753758	66.8550752	27.79
F4-T4	3.66600385	4634.510325	92.6902065	27.4
F5-T4	3.75696505	5714.326508	114.28653	27.15
C1-U	3.85520315	7164.78471	143.295694	26.88
C2-U	3.42586629	2666.037736	53.3207547	28.06
C3-U	3.73877281	5479.902256	109.598045	27.2
V1-U	5.52161229	332362.7058	6647.25412	22.3
V2-U	4.38277809	24142.26938	482.845388	25.43
V3-U	3.60051179	3985.765941	79.7153188	27.58
F1-U	3.74604971	5572.495263	111.449905	27.18
F2-U	3.7606035	5762.401298	115.248026	27.14
F3-U	3.58231955	3822.254074	76.4450815	27.63
F4-U	3.43314319	2711.085337	54.2217067	28.04

F5-U	3.66236541	4595.845348	91.916907	27.41
------	------------	-------------	-----------	-------